

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR NEUROCHIRURGIE
PROF. DR. ALEXANDER BRAWANSKI
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

TRANSPLANTATION VON NEURALEN STAMMZELLEN: INTEGRATION UND
WACHSTUM BEEINFLUSSENDE FAKTOREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Doris Gisela Feigl

2011

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Martin Proescholdt
2. Berichterstatter:	PD Dr. Felix Schlachetzki
Tag der mündlichen Prüfung:	05.12.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	3
1. ALLGEMEINER TEIL.....	5
1.1 HOFFNUNGSTRÄGER NEURALE STAMMZELLEN	5
1.2. NEURALE STAMMZELLEN UND NEUROGENESE IN DER ADULTEN SVZ	6
1.3 EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE NEUROGENESE	9
1.3.1. BMP.....	10
1.3.2. VEGF.....	10
1.3.3 Erythropoetin.....	10
1.3.4 Shh, Smo	11
1.3.5 Wachstumsfaktoren EGF, FGF-2	11
1.3.5.1 EGF	11
1.3.5.2 FGF-2	12
1.3.6 TGF- α	12
1.3.7. BDNF	13
1.4 TRANSPLANTATION VON ADULTEN NEURALEN SVZ-STAMMZELLEN	13
1.4.1 Therapievorteile von adulten neuronalen Stammzellen.....	13
1.4.2 Bisherige Forschungsergebnisse.....	14
1.4.4 Laboreigene Versuchsergebnisse.....	17
1.5 MIKROGLIA	18
1.5.2 Mikroglia und Interaktion mit Neuronen.....	21
1.5.3 Mikroglia und Interaktion mit neuronalen Stammzellen	22
1.6 IMMUNMODULATOREN INDOMETHAZIN UND MINOCYCLIN	23
2. STRATEGIE UND HYPOTHESEN	27
2.1 EXPERIMENT 1: EINFLUSS DER ANZAHL AN TRANSPLANTIERTEN STAMMZELLEN	27
2.2 EXPERIMENT 2: EINFLUSS DER LÄSIONSART	27
2.3 EXPERIMENT 3: WACHSTUM TRANSPLANTIERTER STAMMZELLEN UNTER EINFLUSS VON IMMUN- MODULATION	29
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 MATERIALIEN	30
3.2 SOFTWARE UND GERÄTE.....	30
3.3 REAGENZIEN	31
3.4 DURCHFÜHRUNG DER TIERVERSUCHE.....	33
3.4.1 Tierhaltung, Durchführung der Tierversuche, Tierversuchsgenehmigung	33
3.4.2 Versuchstiere	33
3.5 GEWINNUNG UND ZÜCHTUNG DER SVZ-STAMMZELLEN	33
3.6 EXPERIMENT 1 UND 2: EINFLUSS VON ZELLANZAHL UND LÄSIONSART	34
3.6.1 Bilaterale elektrische und NMDA-Läsionierung der Inselrinde	35
3.6.1.1 Elektrische Läsion	36
3.6.1.2 NMDA-Injektion	36
3.6.2. Transplantation unterschiedlicher Zellkonzentrationen.....	36
3.7 EXPERIMENT 3: WACHSTUM VON TRANSPLANTIERTEN STAMMZELLEN UNTER IMMUNMODULATION	37
3.7.1 Bilaterale elektrische Läsionierung	38
3.7.2 Medikamentenbehandlung.....	38
3.7.2.1 Minocyclin.....	39
3.7.2.2 Indomethazin	39
3.7.3 Transplantation	39
3.8 PERFUSION DER TIERE, GEWEBEFIXATION UND ENTNAHME DER GEHIRNE	39
3.9 AUFBEREITUNG DER GEHIRNE MITTELS KRYOSCHNITTVERFAHREN.....	40
3.10 HISTOLOGISCHE VERFAHREN.....	41
3.10.1 Kresylviolett-(CV)-Färbung	41
3.10.2 Indirekte immunhistologische Färbung von ED1-Antigenen	41
3.11 LICHTMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	43

3.12 STEREOLOGIE	44
3.13 STATISTISCHE AUSWERTUNG	45
4. RESULTATE	46
4.1 ANZAHL DER ZELLEN	46
4.1.1 Wachstums- und Integrationsanalyse anhand der CV-Färbung	46
4.1.2 Makrophagen-Aktivität anhand Zählung ED1-positiver Zellen	50
4.1.2.1 Periphere Zone	50
4.1.2.2 Zentrale Zone	54
4.2 LÄSIONSART	59
4.2.1 Wachstums- und Integrationsanalyse anhand der CV-Färbung	59
4.2.2 Makrophagen-Aktivität anhand Zählung ED1-positiver Zellen	62
4.2.2.1 Periphere Zone	62
4.2.2.2 Zentrale Zone	67
4.3 IMMUNMODULATION	72
4.3.1 Wachstum- und Integrationsanalyse anhand der CV-Färbung	72
4.3.2 Makrophagen-Aktivität anhand Zählung ED1-positiver Zellen	76
4.3.2.1 Periphere Zone	76
4.3.2.2 Zentrale Zone	81
5. DISKUSSION	86
5.1 EINE KRITISCHE BETRACHTUNG DES TECHNISCHEN VERFAHRENS	86
5.1.1 Versuchstieranzahl	86
5.1.2 Schnittqualität	86
5.1.3 Histologische Analyse	87
5.1.4 Funktionalitätsüberprüfung	88
5.2 ANZAHL DER ZELLEN	88
5.3 LÄSIONSART	91
5.4 IMMUNMODULATION	93
6. LITERATUR	97
7. DANKSAGUNG	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bidest.	bidestilliert
CD 68	Cluster of Differentiation 68
CV	Kresylviolett
DCX	Doublecortin
ELx	Elektrische Läsion
GDNF	Glial cell-line-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSA I-B4	Griffonia simplicifolia agglutinin isolectin-B4
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
Kontroll-Puffer	Kontrolle mit Puffer
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
Lx	Läsion
M	Mol
mA	Milliampere
MCAO	Medial cerebral artery occlusion
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mM	Millimol
n. s.	nicht signifikant
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Nitritoxid
NSC	Neurale Stammzellen
NT2/D1	Humane Teratokarzinom-Stammzellen NTera-2/cloneD1

OB	Bulbus olfactorius
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
p. o.	peroral
PSA-NCAM	Polysialytated neural cell adhesion molecule
RMS	Rostral migratory stream
rpm	Umdrehungen pro Minute
SGZ	Subgranuläre Zone
SVZ	Subventrikuläre Zone
Trans.	Transplantation
THA	Threohydroxyaspartat
TNF	Tumornekrosefaktor
TUJ1	β-Tubulin
UTP	Uridintriphosphat
50`Z.	50.000 Zellen
500`Z.	500.000 Zellen

1. Allgemeiner Teil

1.1 *Hoffnungsträger neurale Stammzellen*

„Neurologische Beschwerden entwickeln sich zu regelrechten Volkskrankheiten... Neue Optionen eröffnet möglicherweise die Stammzellentherapie...“. Mit diesen Worten wies Prof. Dr. Gerard Said, Generalsekretär der Organisation der Europäischen Neurologen Gesellschaft (ENS) auf die Stammzelltherapie als viel versprechenden Lichtblick für Patienten mit neurologischen Schäden hin (16. Jahrestagung der ENS, Lausanne / Schweiz, 2006).

Wie bisherige klinische Studien aber zeigen, ist die Komplexität der Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen Stammzellen und Empfängerewebe bei der Stammzelltransplantation noch nicht vollständig erfasst, um sie als Therapieoption routinemäßig bei neurologischen Erkrankungen anbieten zu können (Wechsler, 2009; Roh et al., 2008; Orlacchio et al., 2010). So bildete sich bei einem neunjährigen Jungen, der an Ataxia teleangiectasia erkrankt war, nach einer Stammzelltransplantation ein bösartiger Tumor (Amariglio et al., 2009). Gegenüber einer Firma, die auch neurologisch erkrankten Patienten Stammzellen aus dem eigenen Knochenmark transplantierte, wurde im April 2011 eine Untersagungsverfügung ausgesprochen. Sie bot wissenschaftlich nicht ausreichend nachgewiesene Therapien an, die bei zahlreichen Patienten zu erheblichen Nebenwirkungen führten (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2011).

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit wurden verschiedene Faktoren untersucht, die auf transplantierte adulte, neurale Stammzellen Einfluss nehmen. Zum einen wurde analysiert, inwiefern sich die Menge an Stammzellen auf das Überleben und Integration des Transplantats auswirkt. Zum anderen betrachtete man verschiedene Arten von Läsionen, um herauszufinden, inwieweit lokale Voraussetzungen das Überleben der Transplantate begünstigen. Als relevanter Faktor wurde auch die Entzündungsreaktion bei einer Gewebsschädigung mit einbezogen. Man untersuchte Transplantate und die Abwehrreaktion durch Mikroglia unter entzündungshemmenden Medikamenten wie Indomethazin und Minocyclin.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Hinweise zu erbringen, welche Umgebungsparameter unterstützend auf die Transplantation von neuronalen Stammzellen wirken.

1.2. Neurale Stammzellen und Neurogenese in der adulten SVZ

Neurale Stammzellen (NSC) sind undifferenzierte Zellen, die aus dem Nervensystem entspringen und neurales Gewebe hervorbringen. Sie stammen von pluripotenten Stammzellen, auch Embryonalstammzellen genannt, ab. Die neuronalen Stammzellen haben aufgrund ihrer Multipotenz die Möglichkeit, durch symmetrische Teilung (d. h. es entstehen zwei identische multipotente Zellen) ihre Zellanzahl aufrecht zu erhalten. Ebenso können sie sich durch asymmetrische Zellteilung (d. h. es bleibt die multipotente Stammzelle erhalten und eine neue neurale Vorläuferzelle entsteht) in eine höhere Differenzierungsstufe, d. h. in neurale oder gliale Vorläuferzellen, entwickeln. Diese neuronalen Vorläufer- oder Progenitorzellen besitzen ein eingeschränktes Reproduktions- und Differenzierungspotential. Sie differenzieren sich entweder, falls von neuronalen Vorläuferzellen stammend, zu Neuronen, oder, falls aus glialen Vorläuferzellen entspringend, zu Gliazellen, welche sich weiter in Astrozyten und Oligodendrozyten einteilen lassen (Gage, 2000; Tramontin et al., 2003; zusammengefasst in Picard-Riera et al., 2004).

Bereits in den 1960ern beschrieb Altman, dass nicht nur im fetalen, sondern auch im entwickelten adulten Gehirn Neurogenese, d. h. Neubildung von Nervenzellen, stattfindet (Altman und Das, 1965 und 1966; zusammengefasst in Mackowiak et al., 2004). Weitere Forschergruppen bestätigten diese Entdeckung. So konnte adulte Neurogenese bei Spezies wie Maus, Ratte, Kaninchen, Primaten und im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden (Altman und Das, 1965 und 1966; Eriksson et al., 1998; Kempermann et al., 1997; Guéneau et al., 1982; Gould et al., 1999; zusammengefasst in Mackowiak et al., 2004).

Bisher hat man zwei wesentliche Orte der Neurogenese im adulten Gehirn von Säugetieren entdeckt: Die Subgranuläre Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus im Hippocampus sowie die Subventrikuläre Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels mit Bulbus Olfactorius (OB) (Cameron et al., 1993; Luskin, 1993; Gritti et al., 2002; zusammengefasst in Temple et al., 1999, Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2002, Okano, 2002 und Alvarez-Buylla et al., 2002). Die SVZ bildet dabei die größte Ansammlung neuraler Stammzellen im adulten Säugetiergehirn (Doetsch et al., 1999 und 2002). In geringerer Anzahl sind sie aber auch in nicht-neurogenen Regionen des Gehirns wie z. B. Septum, Striatum, Corpus callosum, Cortex (Palmer et al.,

1995; zusammengefasst in Mackowiak et al., 2004) und Rückenmark (Weiss et al., 1996; zusammengefasst in Mackowiak et al., 2004) gegenwärtig.

Die Architektur der adulten SVZ ist aus bisher vier identifizierten Zellarten aufgebaut: Zahlenmäßig am häufigsten in der reifen SVZ vertreten sind die Neuroblasten, die dem Zelltypus A (PSA-NCAM und TUJ1 positiv) (Lim et al., 1999; Doetsch et al., 1997) zugeordnet sind. Sie bilden untereinander Ketten und wandern entlang eines Netzwerkes aus sogenannten Typ B-Zellen, die ultrastrukturelle Charakteristika von Astrozyten aufweisen (GFAP positiv) und den rostralen migratorischen Strom („rostral migratory stream“, RMS) darstellen, zum Riechkolben (Bulbus Olfactorius, OB). Dort angekommen, differenzieren sich die Neuroblasten (Typ-A-Zellen) zu Interneuronen (Doetsch et al., 1997). Man kann dabei zwischen GABAergen granulären Interneuronen sowie dopaminergen periglomerulären Interneuronen unterscheiden (Betarbet et al., 1996; zusammengefasst in Kuhn et al., 2001).

Die astrozytenähnlichen B-Zellen können anhand ihrer Lokalisation weiter untergliedert werden: B-Zellen, die Kontakt zu Ependymzellen, d. h. Zellen, die die Innenfläche des Ventrikels auskleiden, haben, gehören zum B1-Typ. Dagegen werden B-Zellen ohne Ependymkontakt als B2-Zellen bezeichnet (Doetsch et al., 1997). Typ-C-Zellen teilen sich rasch und füllen, in kleine Zellnester angeordnet, die Lücken des Zellnetzwerkes aus Typ-A- und B-Zellen aus. Die Grenze zwischen SVZ und lateralem Ventrikel bilden zilienträgende Ependymzellen (Typ-E-Zellen). Altman vermutete zunächst, dass die Ependymzellen die eigentlichen Stammzellen sind (Altman, 1961; zusammengefasst in Doetsch et al., 1999). Diese Annahme konnte durch *in vivo* und *in vitro* Studien widerlegt werden. Man beobachtete, dass sich die astrozytären B-Zellen zu den C-Zelltypen entwickelten, welche sich im Laufe der Differenzierung zu A-Zellen verwandelten (Doetsch et al., 1999).

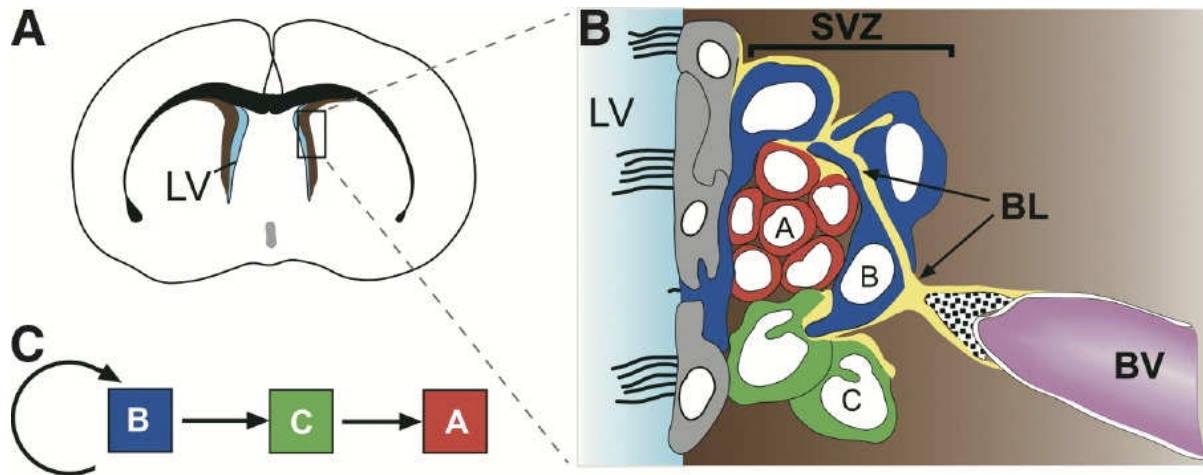


Abb. 1: Adulte Neurogenese in der SVZ:

A) Koronarschnitt durch das adulte Mäusegehirn. Der laterale, mit Liquor gefüllte Ventrikel (LV) mit der angrenzenden SVZ wird in B) dargestellt.

B) Vergrößerter Ausschnitt des lateralen Ventrikels mit SVZ. B-Zellen (dunkelblau) werden als die astrozytären Stammzellen der SVZ angesehen; darunter sind einige durch Zilien in Kontakt mit dem Ventrikellumen. Aus B-Zellen entwickeln sich die sich rasch teilenden C-Zellen (grün). Daraus entstehen Neuroblasten des A-Zelltyps (rot), die entlang des RMS zum Bulbus Olfactorius migrieren. Dort angekommen, differenzieren sie sich zu Interneuronen. Zilien tragende Ependymzellen (grau) kleiden die Ventrikelwand aus. Als Produzenten von neurophilen Faktoren (z. B. Noggin) spielen sie eine wichtige Rolle in der neurogenen Zone. Ebenfalls dargestellt sind Blutgefäße (BV, pink) mit perivaskulären Makrophagen (punktartig) und einer Basallamina (BL, gelb), die mit den SVZ-Zellen eng in Kontakt steht.

C) Zelllinie der SVZ. B-Zellen wirken unter hoher EGF-Konzentration als selbst-reproduzierende Stammzellen der SVZ. Sie differenzieren sich zu C-Zellen, welche sich weiter zu neuroblastischen A-Zelltypen entwickeln (Alvarez-Buylla & Lim, 2004).

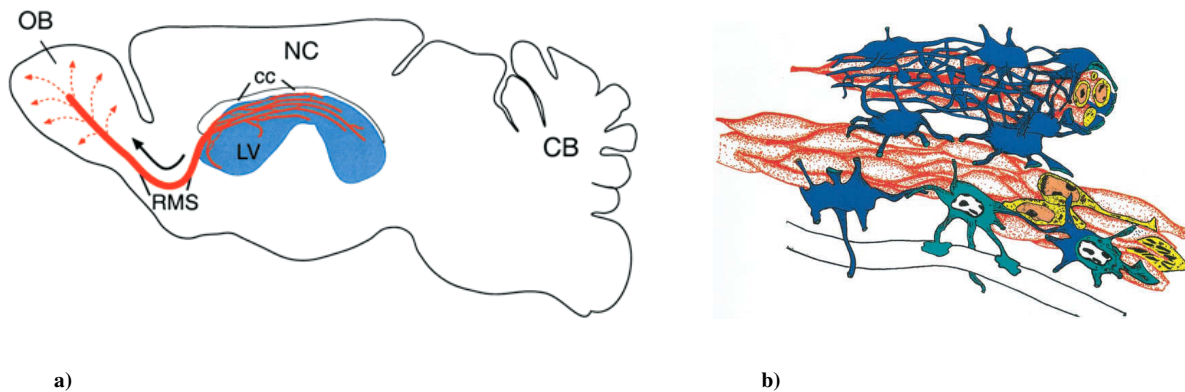


Abb. 2: a) Schematischer Sagittalschnitt des Neocortex (NC) einer adulten Ratte (links Bulbus Olfactorius OB, rechts Kleinhirn CB, zentral Corpus callosum cc) mit Einzeichnung des RMS. Die SVZ entlang des lateralen Ventrikels (LV, blau) gilt als Ausgangspunkt der neuroblastischen A-Zellen. Diese Zellen migrieren in kettenartigem Verbund (rote Linien) entlang des RMS zum Bulbus Olfactorius (OB). Dort angekommen, verteilen sich die jungen Neurone (rote Punktlinien) und differenzieren sich zu granulären und periglomerulären Interneuronen. (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002)

b) Neugebildete Neurone (gelb) wandern in kettenartiger Anordnung (rot) von der SVZ ausgehend entlang des RMS zum Bulbus Olfactorius (OB). Dabei teilen sich die A-Zelltypischen Neurone mitotisch (unten rechts). Sie werden eingehüllt von astrozytären Gliazellen (blau), welche über Zellausläufer Kontakt zu Blutgefäßen besitzen (unten) (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002).

1.3 Einflussfaktoren auf die Neurogenese

Die Entstehung von Neuronen aus Progenitorzellen ist ein außerordentlich komplexer Vorgang, auf den viele verschiedene Faktoren Einfluss nehmen. Die Intensität der Neurogenese wird durch z. B. Alter, physischen und psychischen Stress, Genetik, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone, Signalmoleküle sowie Medikamente reguliert (Mackowiak et al., 2004).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass insbesondere das umgebende Gewebe (*Microenvironment*), bestehend aus extrazellulärer Matrix und freien Signalmolekülen, einen entscheidenden Einfluss auf die adulte Neurogenese und Differenzierung von Neuronen hat (Lim et al., 2000; Gage, 2000; Mercier et al., 2002; zusammengefasst in Alvarez-Buylla und Lim, 2004).

So steht die an die SVZ angrenzende Laminin- und Kollagen-1-reiche Basallamina von Blutgefäßen mit sämtlichen Zellarten der SVZ, vor allem mit Typ-B-Zellen, über Zellausläufer in Verbindung. Aufgrund dieses engen Zellkontaktes haben Mercier und Kollegen vermutet, dass die Basallamina wichtige, von der Matrix produzierte Signalstoffe (Cytokine und Wachstumsfaktoren) moduliert, konzentriert und somit die Neurogenese mit beeinflussen kann (Mercier et al., 2002; zusammengefasst in Alvarez-Buylla und Lim, 2004).

Ebenso wird ein Zusammenhang zwischen der Vaskulogenese und Neurogenese im adulten Gehirn vermutet. Blutgefäße liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zur Basalmembran und den daran angrenzenden Astrozyten (Mercier et al., 2002; zusammengefasst in Alvarez-Buylla und Lim, 2004). Shen et al. fanden heraus, dass Endothelzellen Signalmoleküle sezernieren. Diese fördern *in vitro* die Selbsterneuerung und Neurogenese von NSC (Shen et al., 2004; zusammengefasst in Wurmser et al., 2004).

Im Folgenden werden einige wichtige Botenstoffe, die vom *Microenvironment* produziert werden und Einfluss auf die adulte Neurogenese im Säugetiergehirn nehmen, beschrieben:

1.3.1. BMP

Während der Gehirnentwicklung fördern BMPs (Bone morphogenetic proteins) die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Astrozyten auf Kosten von Neurogenese und Oligodendrogligenese in der SVZ. Später produzieren adulte SVZ Zellen selbst BMP und BMP-Rezeptoren. Noggin, ein BMP-Antagonist, wird in ependymalen Zellen gebildet und neutralisiert den inhibitorischen Effekt von BMPs auf die SVZ-Neurogenese sowohl *in vitro* als auch in ektopen Gebieten *in vivo* (Lim et al., 2000; zusammengefasst in Alvarez-Buylla und Lim, 2004).

1.3.2. VEGF

Als angiogenetischer Wachstumsfaktor besitzt VEGF (vascular endothelial growth factor) zudem auch neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften unter *in vivo* und *in vitro* Bedingungen. Wurde VEGF intraventrikulär injiziert, erhöhte sich die Proliferationsrate von SVZ-Vorläuferzellen (Jin et al., 2002; zusammengefasst in Alvarez-Buylla, 2004). Sun et al. simulierten eine cerebrale Ischämie mittels Verschluss der Arteria media cerebri. Der verursachte Sauerstoffmangel bewirkte eine vermehrte lokale Bildung von VEGF. Auch die externe *in vivo* Injektion von VEGF (intraventrikulär) in eine Ischämiezone verbesserte die Überlebensfähigkeit der neu gebildeten Nervenzellen und verringerte somit das Infarktgebiet (Sun et al., 2003).

1.3.3 Erythropoetin

Hypoxie induziert neben der vermehrten Produktion von VEGF auch eine verstärkte Bildung von Erythropoetin (EPO). Wie Shingo et al. zeigten, produzieren NSC *in vitro* unter hypoxischer Kulturbedingung zwei bis dreimal mehr Neurone bei einer gleichzeitig erhöht gemessenen Genexpression an EPO. Diese verstärkte Neurogenese konnte durch EPO-Antikörper neutralisiert werden.

Durch die intraventrikuläre Infusion von EPO werden *in vivo* die EPO-Rezeptoren von EGF-sensitiven NSC aktiviert. Ihre Anzahl vermindert sich in der SVZ, während die migrierenden Zellen und Interneurone des Bulbus Olfactorius zunehmen. Bei Zugabe von Anti-EPO-Antikörper erhöht sich dagegen wieder die Anzahl der EGF-sensitiven NSC. Die migrieren-

den Zellen sowie die Interneurone werden weniger. Auch *in vivo* zeigt sich somit eine verstärkte Bildung von ausgereiften Nervenzellen unter EPO (Shingo et al., 2001).

1.3.4 Shh, Smo

Ein weiteres Signalmolekül, das die Proliferation und adulte Neurogenese in der SVZ fördert, ist das Sonic hedgehog (Shh). Wird dessen Signalübertragung gehemmt oder stimuliert, sinkt oder erhöht sich die Proliferation von NSC in der adulten SVZ. Fehlt der Shh-Korezeptor Smoothed (Smo), sinkt die Proliferation von NSC in der SVZ (Machold et al., 2003; Lai et al., 2003; zusammengefasst in Goh et al., 2003). Man nimmt an, dass Shh die Proliferation und das Überleben der sich rasch teilenden Typ-C-Zellen in der SVZ unterstützt (Machold et al., 2003; zusammengefasst in Alvarez-Buylla und Lim, 2004).

1.3.5 Wachstumsfaktoren EGF, FGF-2

Während EGF (Epidermal growth factor) und FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) keinen Einfluss auf die Proliferation der hippocampalen Stammzellen aufweisen können, fördern sie *in vitro* und *in vivo* die Zellteilung der Stammzellen der adulten SVZ (Kuhn et al., 1997). Um zu verstehen, wann die einzelnen Faktoren wirken, ist es wichtig, die Entwicklung des Nervensystems zu kennen. FGF-2 sensitive NSC treten *in vivo* am 8,5. Embryonaltag auf. Aus diesen entsteht durch asymmetrische Zellteilung zwischen dem 11. und 13. Embryonaltag eine neue, EGF-sensitive Zellpopulation (Trobepe et al., 1999; zusammengefasst in Okano, 2002).

1.3.5.1 EGF

In vitro formieren sich SVZ-Zellen unter Einfluss von EGF zu neurosphärischen Zellaggregaten. Mit der Eigenschaft der Multipotenz besitzen sie eine geringe Zelldifferenzierung und erhalten ihre Zellanzahl durch symmetrische Mitose (Gage et al., 1995; zusammengefasst in Kuhn et al., 1997). Auch die intraventrikuläre Infusion von EGF erhöht die Zahl neu gebildeter Zellen in der SVZ *in vivo*. Dabei entspricht die Mehrheit der EGF-sensitiven Zellen den hochmitotischen Typ-C-Zellen der adulten SVZ. Unter Einfluss von EGF stellen die Typ-C-Zellen die Bildung von Neuroblasten (Typ-A-Zellen) ein und beginnen, sich proliferativ und invasiv auszubreiten (Doetsch et al., 2002). Dabei erhöht sich die Dichte an neu entstandenen Zellen in der SVZ um ein Neunfaches. Vor allem im medialen und posterioren Abschnitt der

SVZ werden neue Vorläuferzellen gebildet. Zusätzlich werden im angrenzenden Gewebe von Striatum, Cortex und Septum neu gebildete Zellen vorgefunden. Dies kann zum einen durch die Migration der SVZ-Zellen, zum anderen durch die Stimulation von lokalen Stammzellen erklärt werden (Kuhn et al., 1997). Im Gegensatz zur SVZ vermindert sich die Zellzahl im RMS. Schließlich hat sich auch am OB, dem Zielort der migrierenden Progenitorzellen, die Neubildung von Nervenzellen vermindert und das Wachstum von Astrozyten erhöht (Kuhn et al., 1997).

1.3.5.2 FGF-2

Wie EGF erhöht auch das Wachstumshormon FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) nach mehrfachen intraventrikulären Injektionen die Zahl der SVZ-Progenitorzellen (Hyperplasie) *in vivo*, wobei das Ausmaß deutlich geringer ausfällt als unter Einfluss von EGF. Unter FGF-2 verringert sich die Zellmenge im RMS. Im Gegensatz zu EGF lässt FGF-2 im OB vier Wochen nach Beendigung der Infusionen die Zahl an neu gebildeten Zellen, vornehmlich Neuronen, ansteigen (Kuhn et al., 1997).

Gritti und Kollegen fanden heraus, dass Vorläuferzellen aus der adulten SVZ Rezeptoren sowohl für EGF als auch für FGF-2 exprimieren. Somit können sie von beiden Wachstumsfaktoren beeinflusst werden, wobei sich die totale Zellzahl *in vitro* nicht unterscheidet. Lediglich fördert EGF eine schnellere Expansion der Zellen als FGF-2. In Gegenwart beider Faktoren vermehren sich die Zellen stärker als in Anwesenheit der einzelnen Faktoren nacheinander, wobei die Reihenfolge, ob zuerst EGF oder FGF-2 beigegeben wird, unbedeutend ist (Gritti et al., 1999).

1.3.6 TGF- α

Ähnlich wie FGF-2, bewirkt TGF- α (Transforming growth factor α) die Differenzierung der NSC in der SVZ zu Neuronen *in vivo*. Nach Läsionierung der Substantia nigra und intracerebraler Infusion von TGF- α proliferieren SVZ-Vorläuferzellen verstärkt und migrieren zur Infusionsstelle. Bei Verhaltenstests ist ein verbessertes Funktionalitätsvermögen der Tiere beobachtet worden (Fallon et al., 2000; zusammengefasst in Picard-Riera et al., 2004).

1.3.7 BDNF

Als weiterer Botenstoff steht zunehmend BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) im Visier der Forschung. Als Mitglied der Neurotrophine wird er mit der Entstehung von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen sowie der Einflussnahme auf Gedächtnis und Lernvermögen in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Binder und Scharfman, 2004).

Durch intrahippocampale Infusion von BDNF über einen Monat ist dort die Bildung von Neuronen in adulten Ratten angeregt worden (Scharfman et al., 2005). Eine intraventrikuläre Verabreichung fördert die neuronale Zellproliferation im Bulbus Olfactorius (Zigova et al., 1998). Petridis et al. konnten zeigen, dass BDNF dosisabhängig unterschiedlich auf SVZ-Stammzellen einwirkt. Physiologische Konzentrationen des Faktors (1 ng / ml) fördern die Migration von SVZ-Zellen *in vitro*, während die zehnfache Dosis die Zelldifferenzierung unterstützt (Petridis et al., 2011).

1.4 Transplantation von adulten neuralen SVZ-Stammzellen

1.4.1 Therapievorvorteile von adulten neuralen Stammzellen

Wie die aktuell geführte Diskussion über die Präimplantationsdiagnostik zeigt, regulieren ethische und politische Aspekte die Forschung und klinische Therapie mit pluripotenten Embryonalstammzellen im ausgeprägten Umfang. Die medizinische Forschung setzt daher große Hoffnung in die Anwendung von adulten neuralen Stammzellen. Zum einen können diese Stammzellen auch im Erwachsenenalter durch eine Biopsie gewonnen und autolog transplantiert werden (Andres et al., 2008). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit zur Minimierung des immunologischen Reaktionspotentials mit dem Verzicht auf eine längerfristige, wenn nicht sogar lebenslange, Einnahme von Immunsuppressiva für den Patienten. Zum anderen weisen sie ein geringeres Entartungspotential auf als Embryonalstammzellen und erhöhen die dauerhafte Rehabilitationsfähigkeit des Empfängers (Richardson et al., 2004; Rohwedel et al., 2001; zusammengefasst in Bottai et al., 2003). Neben der exogenen Methode, d. h. dass adulte NSC biopsiert, kultiviert und reimplantiert werden, gibt es auch einen endogenen Therapieansatz. Hier werden körpereigene Stammzellen nach Gewebeschädigung *in vivo* durch Behandlung mit verschiedenen Faktoren, wie unter 1.3. beschrieben, zum Wachstum und Zellersatz angeregt (Haas et al., 2005).

1.4.2 Bisherige Forschungsergebnisse

Der Einsatz von adulten NSC konzentriert sich derzeit vor allem auf präklinische labor- und tierexperimentelle und nur vereinzelt auf klinische Studien (Haas et al., 2005; Matsukawa et al., 2009; Roh et al., 2008; Kim und de Vellis, 2009).

Herrera et al. zeigten in Transplantationsversuchen, dass nicht-manipulierte adulte neurale Vorläuferzellen aus der SVZ lediglich im Umgebungsgebiet des Bulbus Olfactorius (OB) ausreichend migrierten und sich differenzierten. In den meisten anderen Regionen des adulten Gehirns besaßen sie dafür nur eine begrenzte Fähigkeit. Es wurden exzitotoxisch läsionierten adulten Mäusen (durch Kainsäure, ein pflanzliches Struktur analogon der Glutaminsäure) unilateral Stammzellgewebe in Striatum, Cortex, Hippocampus und OB transplantiert. Die Transplantate im OB überlebten sowohl in den läsionierten als auch in den nicht-läsionierten Kontrolltieren, migrierten und proliferierten zu Interneuronen. Im Gegensatz dazu verteilten sich die Zellen im Striatum und Cortex nur zu einem begrenzten Ausmaß und differenzierten sich zu Astrozyten. Im Hippocampus, einem natürlichen neurogenen Ort des ausgereiften Gehirns, zeigten die transplantierten Zellen ebenfalls ein geringeres Migrations- und Differenzierungsverhalten. Man nahm an, dass dieses Umgebungsgewebe die Migration der Stammzellen zu gering unterstützt hat (Herrera et al., 1999). Eine weitere Ursache für die fehlende Differenzierung im Hippocampus war möglicherweise, dass das kompakte Transplantatgewebe den Kontakt mit den lokalen Signalmolekülen verhinderte (Lim et al., 2002).

Im Gegensatz zu adulten SVZ-Stammzellen differenzierten sich und migrierten native neonatale SVZ-Stammzellen in verschiedene Regionen adulter Empfängergehirne, z. B. OB, Cortex oder Striatum (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996; Lim et al., 1997; Luskin et al., 1997; zusammengefasst in Zhang et al., 2003). Daraus schlussfolgerte man, dass andere Regionen des Gehirns, außer der OB, im Verlauf der Entwicklung die Fähigkeit verlieren, extrazelluläre Signale, die entscheidend für die Migration der adulten subventrikulären Progenitorzellen sind, zu produzieren. Diese Eigenschaft schrieb man lediglich dem Gewebe des OB zu. (Herrera et al., 1999).

Diese Annahme von der herausragenden Stellung des OB konnten Kirschenbaum und Kollegen widerlegen. Denn drei Wochen nach Entfernung des OB wurde eine Größenzunahme des RMS um 49,3%, nach drei Monaten um 50%, festgestellt. Zu beiden Zeitpunkten blieb die

Zelldichte im RMS konstant, sodass mit der Volumenzunahme proportional eine Steigerung der Gesamtzellzahl einherging. Bedingt war dies am ehesten durch ein Ungleichgewicht von Immigration und Emigration der neu gebildeten Zellen im RMS. Drei Wochen nach der Bulbektomie zeigte sich hinsichtlich des Anteils an apoptotischen Zellen kein Unterschied zu den Kontrolltieren. Erst drei Monate nach der Bulbektomie reduzierte sich der prozentuale Anteil an mitotischen Zellen signifikant um die Hälfte, während sich die apoptotischen Zellen verdoppelten. Am ehesten war dies durch eine gestiegene Zellzahl zu erklären. So wanderten neue Zellen in den RMS ein und vermehrten sich zunächst. Sie verließen diesen Ort aber nicht mehr und starben später ab. Der OB ist also nicht essentiell notwendig für die Proliferation und Migration von SVZ-Vorläuferzellen (Kirschenbaum et al., 1999). Inwiefern Signalfaktoren in der SVZ oder im OB gebildet werden, die die Migration der SVZ-Progenitorzellen lenken, stellt für die zukünftige Forschung ein wichtiges Aufgabenfeld zum Verständnis dieses komplexen Vorgangs dar.

Eine weitere wichtige Beobachtung bezüglich des Wachstums und der Differenzierung von adulten SVZ-Zellen in heterotopen Gehirnarealen gelang Zhang et al.. Sie verwendeten adulte SVZ-Zellen der Ratte für die heterotope Transplantation in intaktes Striatum. Zuvor wurden die Zellen in einem mit FGF-2 angereicherten Medium für acht Tage kultiviert. FGF-2 bewirkte *in vitro* die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen und die Bildung von Neuronen. Vier Wochen nach der Transplantation fanden sich transplantierte Zellen bis zu einer Distanz von 1,5 mm im umgebenden striatalen Gewebe wieder. Im Gegensatz zu den nicht-manipulierten Stammzellen differenzierten sich die mit FGF-2 behandelten Zellen vornehmlich zu striatalen Nervenzellen und nur wenige Zellen zu Astroglia (Zhang et al., 2003). Diese Resultate ließen annehmen, dass native adulte SVZ-Zellen, in heterotopes Gebiet transplantiert, durch intrinsische oder extrinsische Faktoren gehindert werden, zu migrieren. Diese Inhibition konnte durch spezielle *in vitro*-Vorbehandlung aufgehoben werden, sodass sich die Differenzierungsrichtung der Zellen veränderte (Fricker et al., 1999; zusammengefasst in Zhang et al., 2003).

Neueste Forschungsergebnisse berichteten neben dem Zellersatz und die Funktionsübernahme auch über einen immunsuppressiven, neuroprotektiven und neurotrophen Effekt von transplantierten NSC (zusammengefasst in Einstein et al., 2008). Nach intraventrikulärer Transplantation von neuronalen Stammzellen wurde im experimentellen Modell für autoimmune Enzephalitis (EAE) ein Rückgang der Gehirninflammation festgestellt (Einstein et al., 2003;

Pluchino et al., 2005; zusammengefasst in Einstein et al., 2008). Man vermutete eine verstärkte Apoptose unter bevorzugter Aktivierung von den weniger aggressiven T2-Helferzellen (Pluchino et al., 2005; zusammengefasst in Einstein et al., 2008). Die intravenöse Gabe von neuronalen Stammzellen, welche nicht die Blut-Hirn-Schranke passierten, sondern sich in periphere Lymphorgane niederließen und dort mit den T-Lymphozyten interagierten, verringerte die ZNS-Entzündungsreaktion. Es wurden durch die Anwesenheit der NSC weniger entzündungsfördernde Cytokine (z. B. TNF- α) in den Lymphozyten gebildet (Lee et al., 2008; Einstein et al., 2007; zusammengefasst in Einstein et al., 2008 und Pluchino et al., 2008). In einem Versuch mit Rückenmarksschädigung zeigten transplantierte Stammzellen eine neuroprotektive Wirkung auf das umgebende Gewebe. Sie reduzierten die Bildung von Narbengewebe, welches die Kommunikation zwischen Transplantat und Empfängerewebe störte. Zudem reduzierten sich die sekundären Schäden nach Läsionierung des Rückenmarks (Teng et al., 2002; zusammengefasst in Einstein et al., 2008). In einem weiteren Versuch zeigten Llado et al., dass transplantierte Stammzellen Motoneuronen *in vitro* vor exzitotoxischem Schaden bewahrten. Kulturen mit Motoneuronen wurden mit Threohydroxyaspartat (THA), einem Glutamat-Transporter-Inhibitor, versetzt. Nervenzellen starben ab. Durch Hinzufügen von NSC blieben die Neurone erhalten. Verantwortlich dafür wurde der sogenannte „Glial cell-line-derived neurotrophic factor“ (GDNF), ein neurotrophischer Wachstumsfaktor, gemacht, welcher von den Stammzellen sezerniert wurde (Llado et al., 2004).

Als Funktionalitätstest für transplantierte Stammzellen in der Inselrinde dient die konditionierte Geschmacksaversion (CTA). Die Inselrinde ist der zuständige Gehirnbereich für die mnemonische Geschmacksvorstellung. Sie streckt sich rostrocaudal vom lateralen Frontalcortex zur perirhinalen Rinde und dorsoventral vom ventralen Rand des somatomotorischen zum piriformen Cortex (Zilles, 1985; zusammengefasst in Bures et al., 1998). Die CTA ist ein anerkanntes Verfahren zur Überprüfung von Lern- und Gedächtnisvermögen von Nagetieren. Dabei lernen die Tiere, einen neuen Geschmack mit körperlichen Veränderungen wie Übelkeit und Erbrechen zu verbinden und ihn zu vermeiden. Die intragastrische Verabreichung von Lithiumchlorid löst Übelkeit aus und bewirkt bei den Tieren eine Aversion gegen das mit Saccharin versetzte Wasser. Dieses Abwehrverhalten gegen das Saccharin-Wasser wird durch die Zerstörung des gustatorischen Cortex mittels der Elektroläsion im Bereich der Inselrinde ausgelöscht und die Trinkmenge steigt an. In einem Versuch mit Transplantation von homotopen fetalem Gewebe in die läsionierte Inselrinde wurde die CTA durchgeführt. Es zeigte

sich, dass die Tiere mit den Transplantaten die Fähigkeit zur Assoziation zwischen Geschmacksrichtung und Übelkeit wiedererlernten und sich von den nicht-läsionierten Kontrolltieren nicht signifikant unterschieden (Bures et al., 1998). In einem weiteren Versuch wurde fetales occipitales, tectales Gewebe sowie Gewebe aus dem Inselrindenbereich in den läsionierten gustatorischen Neocortex transplantiert. Im Gegensatz zu den homotop transplantierten Tieren erlangten die Tiere mit heterotopem Spendergewebe kein positives Ergebnis in der CTA. Histochemische Analysen ergaben, dass das fetale Gewebe im Empfänger weiter proliferierte und neuronale Verbindungen zum Spendergewebe aufbaute. Im Gegensatz dazu konnte sich das heterotop transplantierte Gewebe weniger gut integrieren und wurde durch das Entstehen von glialen Narben, Nekrosen und Vakuolen im Wachstum gehindert (Bures et al., 1998).

1.4.4 Laboreigene Versuchsergebnisse

Laboreigene CTA-Versuche zeigten, dass sich transplantierte adulte Stammzellen aus der SVZ im Empfängergewebe integrieren und differenzieren konnten. Die Versuchstiere erlangten zum Teil die Fähigkeit wieder, sich an einem bestimmten Geschmack zu erinnern. Dabei wurden adulte Ratten im Bereich der Inselrinde elektrisch läsioniert und für die CTA getestet. Die läsionierten Tiere zeigten im Gegensatz zu Tieren mit intakter Inselrinde ein signifikant fehlendes Aversionsverhalten auf. Anschließend transplantierte man einem Teil von ihnen adulte, kultivierte SVZ-Stammzellen in den Bereich der Inselrinde. Eine weitere Gruppe erhielt embryonale Stammzellen aus der SVZ. Nach zwei Monaten wurde erneut die CTA durchgeführt. Während die läsionierten, nicht transplantierten Tiere weiterhin keine Aversion zeigten, erlangten die transplantierten Tiere teilweise die Fähigkeit des Aversionsverhaltens wieder. Histologische Analysen zeigten eine beachtliche Migration und Integration der transplantierten Zellen in das Empfängergewebe, wobei die embryonalen die adulten Zellen übertrafen (Piña et al., 2004).

Um sich das unterschiedliche Integrationsverhalten der Transplantate erklären zu können, untersuchte man das Gewebe hinsichtlich der Aktivität und Verteilung der phagozytären Zellen, die im zentralen Nervensystem agieren. Die ED1-Färbung markiert aktivierte Mikroglia sowie aktivierte Makrophagen und Monozyten. Es zeigte sich, dass, je mehr ED1-positive Zellen sich in der Umgebung der Transplantate befanden, diese umso schlechter gewachsen

und im Empfängerewebe integriert waren. Dies fand man überwiegend bei den Tieren mit adulten NSC-Transplantaten. Eine bessere Integrität des Transplantats mit verminderter ED1-positiven Zellanzahl wiesen die Versuchstiere mit embryonalem Transplantat auf (Piña et al., 2004).

1.5 Mikroglia

1.5.1 Mikroglia und Gehirnschädigung

Das Zentralnervensystem besteht aus Nervenzellen (Neurone) und speziellem Bindegewebe (Gliazellen, griech. glia= Leim). Die Gliazellen selbst werden in Makroglia, bestehend aus Astrozyten und Oligodendrozyten, und Mikroglia eingeteilt (Trepel, 1999).

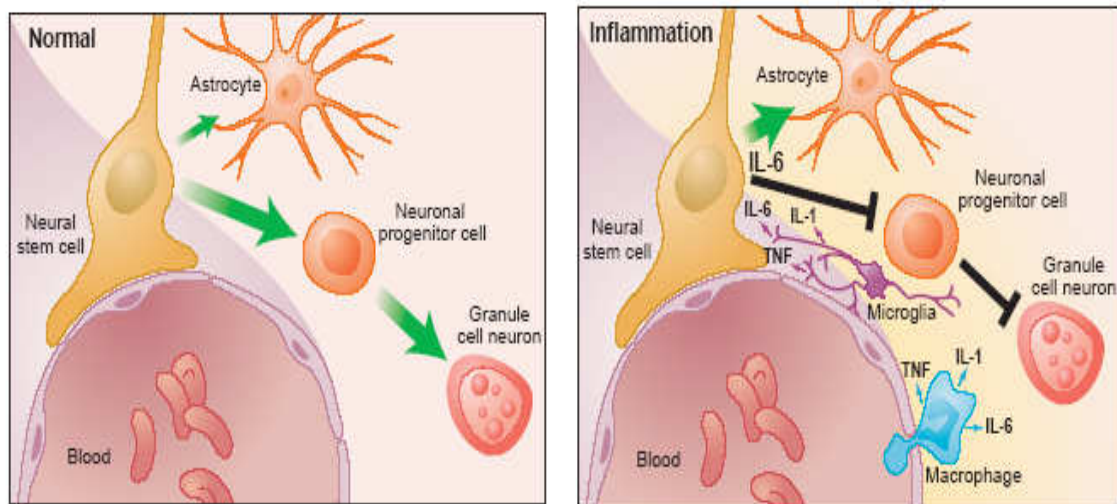
Über die Herkunft der Mikroglia wurde lange Zeit wissenschaftlich diskutiert. Del Rio-Hortega beschrieb bereits 1932, dass Mikroglia aus der mesodermalen Makrophagen-Linie abstammt und im Gehirn als phagozytierende Zellen verweilt. Ihre Vorläuferzellen wandern während der embryonalen und perinatalen Entwicklung aus dem peripheren Blut ins Gehirn ein und verweilen dort für den Rest ihrer Existenz (Ling et al., 1980; zusammengefasst in Kim und de Vellis, 2005).

Mikroglia erreicht verschiedene Aktivierungszustände. Sie kann ruhen, aktiviert oder sogar überaktiviert werden. Entsprechend des Aktivitätsstadiums verändert sie ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften.

Unter normalen, physiologischen Bedingungen befindet sich Mikroglia in einem ruhenden (*quieszenten*) Zustand. Sie besitzt viele Zellausläufer mit bis zu vier Teilungsgenerationen, so dass sich die Kontrollbereiche der einzelnen Zellen annähernd überlagern. Bisher nahm man an, diese Zellausläufer wären ebenso wie die von Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen im Umgebungsgewebe fixiert. *In vivo*-Versuche von Nimmerjahn et al. und Davalos et al. zeigten unter der Verwendung eines gering invasiv arbeitenden transkranialen Mikroskops jedoch das Gegenteil. Während der Zellkörper an Ort und Stelle blieb, streckten und kontrahierten sich die Zellausläufer von quieszenter Mikroglia kontinuierlich, so dass der Extrazellulärraum mehrmals täglich auf Signale für Zellschädigungen kontrolliert wurde (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005; zusammengefasst in Raivich, 2005).

Als immunkompetente, antigenpräsentierende Zelle besitzt Mikroglia, entsprechend peripheren immunkompetenten Zellen, verschiedene Oberflächenrezeptoren und -antigene. Zur Antigenpräsentation besitzt sie MHC I und II, β 2-Integrin, Immunglobulin-Fc γ -Rezeptoren und das B7-Antigen (Williams et al., 1992; De Simone et al., 1995; zusammengefasst in Kim und de Vellis, 2005). Letzteres wird auf allen anderen im Organismus vorkommenden, voll immunkompetenten, antigenpräsentierenden Zellarten (Makrophagen, B-Zellen, T4-Helferzellen, dendritische Zellen und Langerhanszellen) gefunden (June et al., 1994; zusammengefasst in Kim und de Vellis, 2005). Seine Genexpression wird gefördert durch IL-2, IL-4, IFN- γ und Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor. Die Bildung des B7-Antigens wird gehemmt durch antiinflammatorisches IL-10 (Azuma et al., 1993; Ding et al., 1993; zusammengefasst in Kim und de Vellis, 2005).

Mikroglia weist spezifische, einwärts gerichtete Kaliumkanäle auf, die in peripheren Makrophagen und anderen Gliazellen nicht vorhanden sind. Diese Eigenschaft macht Mikroglia empfindlich für einen extrazellulären Kaliumanstieg, der durch Zelltod oder neuronale Aktivierung bedingt wird (Kettenmann et al., 1990; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999). Folglich führt exzessive Stimulation von Nervenzellen zur Überstimulation von Mikroglia. Dies zieht eine mikrogliale Überproduktion an proinflammatorischen Cytokinen und folglich toxische Reaktionen und Zelltod nach sich (Hanisch, 2002).



a) b)
Abb. 3: a) Normales Gehirnparenchym: Neurale Stammzellen der SVZ differenzieren sich entweder zu astrozytären oder neuronalen Vorläuferzellen, welche sich weiter zu granulären Nervenzellen entwickeln.
b) Entzündliches Gehirnparenchym: Makrophagen des ZNS bzw. aus dem peripheren Blut dringen in das Gehirnparenchym ein und geben proinflammatorische Signalstoffe (z. B. TNF, Interleukine) an die Umgebung ab. Diese Cytokine, insbesondere IL-6, hemmen die Differenzierung der neuralen Stammzellen zu Nervenzellen und begünstigen damit die vermehrte Neubildung von Astrozyten (Kempermann & Neumann, 2003).

Die Aktivierung von Mikroglia wird in mehreren Stufen eingeteilt:

Bei Zellschädigung tritt neben Kalium auch Intrazellulärsubstanz in den Extrazellularraum aus. Zellmembranlipide, intrazelluläre Purine (ATP, ADP, UTP) strömen aus und leiten Mikroglia direkt zu den zugrunde gegangenen Zellen (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005; zusammengefasst in Raivich, 2005 und in Peterson und Dailey, 2004). Zudem produzieren geschädigte Nervenzellen Substanzen wie TNF- α , NO, IL-6, IL-1 β und weitere Cytokine in stark erhöhten Konzentrationen (Fawcett et al., 1999; Polazzi et al., 2002) und aktivieren die entsprechenden Rezeptoren der Mikroglia. Diese proliferiert und wechselt vom ruhenden in den amöboiden Zustand über. Aktivierte Mikroglia besitzt ein amöbenartiges Aussehen mit rundlichem, sich vom Ort bewegenden, motilem Zellkörper mit sich streckenden und kontrahierenden Filopoden. Während Mikroglia von Chemokinen zum Verletzungsgebiet geleitet wird, schüttet sie selbst immunmodulierende Proteine, wie z. B. Histokompatibilitäts- und Komplementproteine, aus (Gehrmann et al., 1995; Streit et al., 1989a, b; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999).

Der nächste Schritt beinhaltet die Umwandlung der Mikroglia in vollständig immunkompetente Makrophagen (Streit und Kreutzberg, 1988). Als Mitglied der Makrophagen-Linie produziert und sezerniert Mikroglia proinflammatorische, antiinflammatorische und immunmodulierende Cytokine wie z. B. Interleukine (z. B. 1 β , 6, 8, 10, 12, 13, 15), Interferone (IFN), TNF- α (Tumornekrosefaktor) und CSF (Kolonie-stimulierender Faktor) zur Regelung von Wachstum, Differenzierung und Aktivitäten (Hanisch, 2002; Kim und de Vellis, 2005; Shin et al., 2004). Außerdem hat sie selbst Rezeptoren für IL-1, -5, -6, -8, -10, -12, -15 und TNF- α . Im Gegensatz zur humanen Mikroglia weist die Mikroglia der Nagetiere weitere IL-Rezeptorsubtypen auf, sodass die Mikroglia einzelner Spezies unterschiedliche Eigenschaften besitzen (Sawada et al., 1993; zusammengefasst in Kim und de Vellis, 2005). Trifft Mikroglia auf degenerierte Zellen, phagozytiert sie diese. Kürzlich zugrunde gegangene Zellen werden dabei schneller phagozytiert als bereits schon länger apoptotische Zellen. Diese Beobachtung konnte vom bisherigen Kenntnisstand her allerdings nicht erklärt werden (Peterson und Dailey, 2004).

Nach dem Phagozytieren von toxischen Zelltrümmern induziert Mikroglia die Proliferation von Astrozyten. Diese füllen das betroffene Gebiet aus und bilden eine gliale Narbe, die für Axone eine unpassierbare Barriere darstellt und intakte Nervenzellen von geschädigtem Gewebe fernhält (Bruce-Keller, 1999). Zuletzt wird die mikrogliale Entzündungsreaktion durch

programmierten Zelltod der Makrophagen gestoppt (Gehrmann und Banati, 1995; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999).

Kommt es bei Gehirnschädigungen zur außerordentlich hohen Bildung von Radikalen (wie z. B. NO, TNF- α , Superoxid) bzw. kann aktivierte Mikroglia durch fehlende antiinflammatorische Stoffe (IL-10, IL-13) nicht zur Apoptose gebracht werden, kommt es zur Überaktivierung von Mikroglia. Dies führt zu einem erheblich verstärkten Neuronentod in einem Areal, der über den ursprünglich betroffenen Gehirnbereich hinausreicht. Man nimmt an, dass die mikrogliale Aktivierung eine wichtige Rolle in der Entstehung progressiver neurodegenerativer Krankheiten spielt (Kreutzberg, 1996).

1.5.2 Mikroglia und Interaktion mit Neuronen

Während der perinatalen Entwicklung des ZNS fallen in genetisch vorprogrammiertem Ausmaß Zelltrümmer von abgestorbenen Nervenzellen und Axonen sowie überschüssig produzierte Zellen an. Mikroglia phagozytiert diese und trägt somit zur regelhaften Ausbildung des Gehirns bei (Ashwell, 1990; Pearson et al., 1993; Cunningham, 1982; Oppenheim et al., 1990; zusammengefasst in Kim und de Vellis, 2005).

Im ausgewachsenen Gehirn übernimmt Mikroglia überwiegend immunkompetente Aufgaben. Mechanische und ischämische Schädigung sowie zelluläre Übererregung beeinträchtigen die Nervenzellen. Eine besondere Rolle als Verbindungsglied zwischen neuronaler Überaktivierung und mikroglialer Modulation spielt der Tumornekrosefaktor α (TNF- α). So erhöht sich nach einem ischämischen Ereignis innerhalb von 1-4 Stunden die TNF- α -Expression in Nervenzellen rapide. Der für weiterhin drei bis fünf Tage akzelerierte TNF- α -Spiegel wird durch mikrogliale TNF- α -Bildung bewirkt (Liu et al., 1994; Kim, 1996; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999) und die weitere astrozytäre Glutamatsekretion stimuliert (Bezzi et al., 2001; zusammengefasst in Hanisch, 2002). Die zellschädigende Cytokinsekretion wird von beiden Zelltypen aufrecht erhalten und gegenseitig verstärkt. Neben neuronaler Übererregung verursacht auch Stress eine erhöhte TNF- α -Freisetzung. Infundiert man NMDA in striatales Gewebe, nimmt die TNF- α -Expression in Neuronen zu (Szarflarski et al., 1995). *In vitro* Versuche ergaben, dass TNF- α die Freisetzung weiterer Cytokine, wie z. B. IL-1 β , stimulierte (Griffin et al., 1989; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999).

Durch Bildung und Sezernierung von neuroprotektiven Faktoren wie z. B. Fibroblasten-Wachstumsfaktor- (FGF)-2 und Nervenwachstumsfaktor (NGF) schützt Mikroglia aber auch Nervenzellen (Heumann et al., 1987; Gomez-Pinilla et al., 1990; Araujo et al., 1992; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999). Kitamura et al. injizierten exogene Mikroglia intracerebroventrikulär während einer fokalen Hirnischämie (Verschluss der Arteria cerebri media). Die verabreichten Makrophagen wanderten in das Insultgebiet und reduzierten im Vergleich zur Kontrollgruppe den Umfang des neurodegenerativen Gebietes. Dabei konnte zwischen dem Einsatz von 4.000 versus 40.000 Zellen hinsichtlich des Wirkungsgrades kein relevanter Unterschied gefunden werden (Kitamura et al., 2003).

Es wird davon ausgegangen, dass Mikroglia sowohl einen neurodegenerativen als auch neuroprotektiven Einfluss auf Nervenzellen und auch auf die Neurogenese ausübt. Kommt es zu einer anhaltenden Schädigung der Gehirnzellen und somit dauerhaften Stimulierung von Mikroglia, entstehen chronische degenerative Nervenerkrankungen wie z. B. Multiple Sklerose oder Alzheimer-Demenz (McGeer et al., 1995; Bö et al., 1994; zusammengefasst in Kim und de Vellis, 2005).

1.5.3 Mikroglia und Interaktion mit neuronalen Stammzellen

Nach einer Gehirnschädigung wird Mikroglia von verschiedenen Botenstoffen an den Ort des Zellunterganges angelockt. Es kommt zur Phagozytose von abgestorbenen und absterbenden Zellen (Streit, 2001; Bruce-Keller, 1999). Nach dem Abräumen des verloren gegangenen Gewebes muss nun dieses mit funktionstüchtigen Zellen ersetzt werden. Da sich in diesem Bereich insbesondere aktivierte Mikroglia aufhält, wird vermutet, dass Mikroglia Einfluss auf die Migration von Stammzellen zur Läsionsregion hat (Aarum et al., 2003). In der aktuellen Forschung wird kontrovers darüber diskutiert, ob Mikroglia auf neurale Stammzellen schädlich oder förderlich einwirkt.

Der schädliche Effekt von aktivierter Mikroglia auf neugebildete Neurone wird auf die mikrogliale Bildung und Sezernierung von Cytokinen, insbesondere IL-6, zurückgeführt. Rekombinantes IL-6 minimierte die *in vitro* Neurogenese signifikant um etwa 50 %, während IL-1 β und INF- γ eine geringere Wirkung zeigten. Dabei handelte es sich vielmehr um unspezifischen Zelluntergang, Verminderung neuronaler Zelldifferenzierung und Zunahme von

astroglialer Zelldifferenzierung als um eine unterdrückte Proliferation der Vorläuferzellen. Wurde das IL-6 mit Antikörpern neutralisiert, erholte sich die Neurogenese vollständig (Monje et al., 2003; Kempermann und Neumann, 2003).

Dagegen stellten Aarum et al. fest, dass sich *in vitro* embryonale und adulte neurale Stammzellaggregate der Maus nach Kultivierung in EGF entlang eines Gradienten von Mikroglia-konditioniertem Medium stärker ausbreiteten als im Kontrollmedium. In embryonalen als auch adulten EGF-vorbehandelten Stammzellkulturen waren wesentlich mehr Neurone als Astrozyten im Mikroglia-versehenen Medium zu finden als im Kontrollmedium. Mikroglia nahm hier Einfluss auf die Differenzierung der Stammzellen zur Bildung von neuen Nervenzellen (Aarum et al., 2003).

1.6 Immunmodulatoren Indomethazin und Minocyclin

Unabhängige Forschungsgruppen zeigten, dass durch Einsatz von immunmodulierenden Medikamenten die neurodegenerative Wirkung von Mikroglia verringert und Neurogenese aktiviert werden konnte. Im Folgenden werden zwei immunmodulierende Medikamente vorgestellt, welche in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden: Indomethazin und Minocyclin.

Indomethazin gehört zur Gruppe der nicht-steroidalen entzündungshemmenden Medikamente (NSAR). Es wirkt inhibitorisch auf die ubiquitär vorkommende und prostacyclinbildende Cyclooxygenase 1. Zusätzlich hemmt es die lediglich in Gehirn, Uterus und Niere vorkommende, proinflammatorische Cyclooxygenase 2 mit einer Verminderung an Prostaglandinbildung (Fosslien, 2000). Durch die Stabilisierung der Gefäßpermeabilität und Verminderung der Anzahl aktivierter peripherer Monozyten trägt Indomethazin einen gewichtigen Anteil zur Erholung des *Microenvironments* bei (Reichman et al., 1986; Monje et al., 2002; zusammengefasst in Monje et al., 2003). Sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien zeigte sich, dass Indomethazin aufgrund seiner auf kleine Widerstandsgefäße wirkenden vasokonstriktorisches Eigenschaft den intracerebralen Druck senkt und die cerebrale Perfusion bei Gehirnschaden verbessert (Rasmussen, 2005).

Man beobachtete im klinischen Alltag, dass Patienten, die sich einer Bestrahlungstherapie unterziehen mussten, noch Jahre später unter cerebralen Defiziten litten. Insbesondere wiesen sie verminderte hippocampale Leistungen wie Gedächtnis- und Lernfähigkeit auf (zusammengefasst in Monje et al., 2002). In einem tierexperimentellen Versuch fanden Monje et al. heraus, dass sich die Inflammation während und nach der Radiatio verstärkte und sich der Anteil an proliferativen neuronalen Vorläuferzellen im Hippocampus *in vivo* verminderte. Wurde Indomethazin mit einer Dosis von 2,5 mg / kg Körpergewicht zweimal täglich p. o. einen Tag vor Bestrahlungsbeginn bis zu 2 Monate lang verabreicht, erhöhte sich der relative Anteil an proliferativen neuronalen Zellen im Hippocampus um das 2,5fache im Vergleich zu Kontrolltieren (Monje et al., 2002). Die Forschungsgruppe stellte in einem weiteren Projekt fest, dass aktivierte Mikroglia die adulte Neurogenese im Hippocampus unterdrückte. Unter Einsatz von entzündungshemmend wirkendem Indomethazin konnte die durch i. p. Injektion (2,5 mg / kg i. p. zweimal täglich) von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) ubiquitär ausgelöste Entzündungsreaktion (über IL-6, TNF- α) jedoch geblockt und die hippocampale Neurogenese wieder angeregt werden (Monje et al., 2003). Im Hinblick auf die unter normalen und gesunden Bedingungen ablaufende Neurogenese hatte Indomethazin keinen Einfluss, wohl aber auf die entzündlich beeinträchtigte Neurogenese (Monje et al., 2002). Zugleich zeigte sich ein negativ proportionales Verhältnis zur Anzahl an aktivierter Mikroglia (Monje et al., 2003).

Hoehn und Kollegen untersuchten 2005 ebenso die Neurogenese nach Insult im Tiermodell unter dem Einfluss von NSAR. Indomethazin wurde mit einer oralen Dosis von 2,5 mg / kg zweimal täglich drei Tage vor dem Gefäßverschluss der Arteria cerebri media (MCAO) verabreicht. Unter Indomethazin stieg die Anzahl an neu entstandenen DCX-, GFAP-markierten Zellen um das 2-5fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso reduzierte sich das Verhältnis von ED1-positiven Zellen unter Indomethazin signifikant im Bereich von Striatum und Cortex (Hoehn et al., 2005).

Ein weiteres in der Forschung angewandtes Medikament, mikroglial ausgelöste oder unterhaltene Entzündungsreaktionen pharmakologisch zu dämpfen, ist Minocyclin. Das halbsynthetische, Blut-Hirn-Schranken-gängige Tetracyclin wird routinemäßig als Breitspektrumantibiotikum (3 mg / kg täglich) bei Infektionen mit gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie Rickettsien, Mykoplasmen und Chlamydien verwendet (Karow, 2004). In höheren Dosen (22-100 mg / kg i. p. oder p. o., mehrmals täglich) verwendet, wirkte

es bei tierexperimentellen Hirnverletzungen neuroprotektiv (Fagan et al., 2004; zusammengefasst in Matsukawa et al., 2009). Es verminderte *in vitro* die Stimulation der induzierbaren NO-Synthase und inhibierte das IL-1 β -konvertierende Enzym, welche vor allem in Mikroglia vorhanden ist. Minocyclin inhibierte zudem die in Mikroglia vorkommende p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase (*p38 MAPK*) (Tikka et al., 2001). Glutamat aktivierte die *p38 MAPK*, die letztendlich in der Sekretion von neurotoxischem IL-1 β und NO endete. Damit verhinderte Minocyclin einen Neuronenuntergang, der durch eine enorme Glutamatfreisetzung verursacht wurde (Tikka et al., 2001). Auch unter *in vivo*-Bedingungen konnte die Reduktion von NO und die Blockade von IL-1 β -konvertierendem Enzym nachgewiesen werden (Yrjänheikki et al., 1998).

Ekdahl et al. zeigten, dass die Injektion von LPS Mikroglia aktivierte und die Neurogenese im Hippocampus sowie das Überleben der neu gebildeten Nervenzellen negativ beeinflusste. Intraperitoneale Verabreichung von Minocyclin (50 mg / kg i. p. zweimal täglich an den ersten zwei Tagen, an den folgenden 5 Tagen jeweils einmalige Verabreichung, anschließend 25 mg / kg einmal täglich) hingegen unterdrückte die Aktivität von Mikroglia. Die Anzahl an neugebildeten Neuronen stieg im Vergleich zu nicht behandelten Kontrolltieren deutlich an (Ekdahl et al., 2003). Wie Indomethazin (Monje et al., 2002) wirkte sich auch Minocyclin in diesen Versuchen in intaktem Gehirngewebe nicht negativ auf die Neurogenese aus (Ekdahl et al., 2003).

Neuere Studien stehen der neuroprotektiven Wirkung von Minocyclin aber zunehmend kritisch gegenüber. Matsukawa et al. konnten eine dosisabhängige, neuroprotektive bzw. toxische Wirkung von Minocyclin bei Hirninsulten aufweisen. Bei einer intravenösen Behandlung von 20 mg / kg Minocyclin ab 60 Minuten nach Reperfusion zeigten sich drei Tage nach dem ischämischen Ereignis signifikant weniger motorische und neurologische Defizite als in der Kontrollgruppe. Währenddessen wurde in der Gruppe mit einer Medikamentendosis von 100 mg / kg eine signifikante Verschlechterung ihrer neurologischen Ausfälle und leichte Progredienz der motorischen Einschränkungen gefunden. Diese Beobachtungen konnten in der histologischen Aufarbeitung des Gewebes bestätigt werden. So waren die Läsionsgrößen in der Gruppe mit der niedrigeren Dosis signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Die Gruppe mit der höheren Medikamentendosis wies einen deutlich stärkeren Gewebeschaden auf als die Kontrolle. Es ergab sich in der Gruppe mit der niedrigen Dosis eine höhere Über-

lebenschance für Neurone sowohl im Läsionsgebiet als auch im Periinfarktareal (Matsukawa et al., 2009).

Deierborg et al. entnahmen nach cerebraler Schädigung (MCAO oder Quiloninsäure) SVZ-Gewebe und kultivierten es in Anwesenheit von EGF und FGF-2. Die sich gebildeten SVZ-Neurosphären, die mit Mikroglia aus geschädigtem Gewebe kultiviert wurden, zeigten mehr Wachstum als Neurosphären ohne Anwesenheit von aktivierter Mikroglia. In der Gruppe, die mit Minocyclin behandelt worden war, war deutlich weniger Neurosphärenwachstum vorhanden als in der Gruppe ohne Minocyclinbehandlung (Deierborg et al., 2010).

Wie die oben geschilderten Versuche zeigen, können die einzelnen Zelltypen auf nur geringe Veränderungen der Umgebungsfaktoren und Medikamentenkonzentrationen durchaus wesentlich verschieden reagieren. Dies wiederum wirkt sich letztendlich entscheidend auf das Ausmaß der Gehirnschädigung aus. Umso wichtiger ist es daher für die aktuelle Forschung, die einzelnen Faktoren, ihre Wechselwirkungen und Mechanismen aufzudecken. Nur so wird eine kontrollierte Therapie mit Stammzellen möglich sein.

2. Strategie und Hypothesen

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Faktoren untersucht, welche transplantierte adulte neurale SVZ-Stammzellen in ihrem Wachstum und ihre Integration ins Empfängergewebe beeinflussen können. Als Pilotprojekt gedacht, sollen die Ergebnisse hieraus als Basis für die Planung und Durchführung weiterer Untersuchungen dienen.

2.1 Experiment 1: Einfluss der Anzahl an transplantierten Stammzellen

In einer Versuchsanordnung wurde untersucht, inwieweit die transplantierte Zellmenge das Wachstum der neuronalen Stammzellen und die phagozytäre Abwehrreaktion beeinflusst.

Wir vermuteten, dass bei einer transplantierten Zellmenge von 500.000 Zellen / 5 μ l prozentual mehr Stammzellen überleben und sich in das Empfängergewebe integrieren könnten als bei einer kleineren Menge von 50.000 Zellen / 5 μ l.

2.2 Experiment 2: Einfluss der Läsionsart

Ein weiteres Experiment sollte feststellen, inwiefern sich die Art der Läsion auf die Integration und das Wachstum von transplantierten Stammzellen wirkte. Es wurde in intakte Inselrinde und in die Inselrinde mit vorangegangener Läsion durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Injektion oder Elektroläsion transplantiert.

Um den unterschiedlichen Effekt der beiden Läsionsarten auf das Empfängergewebe zu verstehen, wird im Folgenden deren Mechanismus näher erläutert:

Bei der NMDA-Läsion wird eine Lösung mit NMDA injiziert, welches die entsprechenden neuronalen NMDA-Rezeptoren besetzt und die unten beschriebenen Abläufe in den Neuronen aktiviert.

Glutamat spielt als exzitatorischer Neurotransmitter eine große Rolle in der Übererregung und im Untergang von Nervenzellen (Arundine et al., 2004). Es bindet an metabotropen und ionotropen Rezeptoren, wobei der NMDA-Rezeptor (NMDA-R) den wichtigsten davon darstellt (Gagliardi, 2000). Der NMDA-R ist ein liganden-gesteuerter Ionenkanal, der durch Glutamat geöffnet wird. Als Reaktion auf die Aktivierung strömt als bedeutendstes Elektrolyt Calcium, im geringeren Umfang auch Natrium in die Nervenzelle ein und verursacht ein Zellödem (Gagliardi, 2000). Der exzessive Anstieg von intrazellulärem Calcium setzt weitere Mechanismen in Gang. So aktiviert Calcium die Proteinkinase C, welche postsynaptische Rezeptoren für Glutamat sensibilisieren und dadurch die Übererregbarkeit verstärken kann.

Ferner aktiviert es Phospholipasen, welche durch enzymatische Lipidperoxidation die neuronalen Zellmembranen zerstören. Arachidonsäure wird produziert und erhöht damit die Freisetzung von Prostaglandinen und Leukotrienen, vor allem Thromboxan A2 und Prostacyclin. Diese verschiedenen Abläufe führen letztendlich zur Vasokonstriktion und Ischämie des Gewebes (Gagliardi, 2000).

Zusätzlich wirkt Calcium neurotoxisch durch die Aktivierung von weiteren Proteasen wie z. B. die neuronale und induzierbare Nitritoxidsynthase (nNOS und iNOS). Freie Radikale wie Peroxynitrate und Hydroxylradikale werden dadurch produziert und stimulieren wiederum die Lipidperoxidation mit der Folge von Zellmembranschädigung (Gagliardi et al., 2000).

Durch die Aktivierung einer weiteren Phosphatase, Calcineurin, wird über mehrere Folgeschritte mitochondriales Cytochrom C freigesetzt, welches über weitere Zwischenschritte letztendlich Caspase-3 aktiviert (Wang et al., 1999; zusammengefasst in Banasiak et al., 2000). Caspase-3 führt zur Stimulierung einer DNase, welche schließlich durch DNA-Spaltung in der Apoptose endet (Sakahira et al., 1998; zusammengefasst in Arundine et al., 2004).

Alternativ kann Glutamat auch p53, ein Tumorsuppressorgen, aktivieren, welches nach weiteren Reaktionsschritten ebenfalls den programmierten Zelltod einleitet (Uberti et al., 1998; Xiang et al., 1998; zusammengefasst in Banasiak et al., 2000 und Arundine et al., 2004).

Schließlich führt die durch Glutamat bewirkte Überstimulation der NMDA-Rezeptoren zum neuronalen Zelltod (Lipton und Rosenberg, 1994; zusammengefasst in Lynch et al., 2002).

Dagegen werden bei der Elektroläsion durch elektrische Energie sämtliche lokale Zellen, so auch die Gefäßversorgung und Stützgewebe, zerstört. Die Umgebungsvoraussetzungen für die transplantierten Stammzellen sind hier deutlich eingeschränkt. Die Elektroläsion wurde als Hohlraum mit nekrotischer Penumbra und umgebendem Ödem beschrieben. Das umgebende Gewebe sei hinsichtlich Struktur und Funktion intakt. Neue Läsionen haben sämtliche Gewebsanteile wie Glia, Neurone, Zellausläufer und Blutgefäße verloren; innerhalb von drei Wochen werde das Material phagozytiert (Compston, 2007). Während der Elektroläsion entstehe im Bereich der Elektrode eine elektrochemische Zersetzung und Austrocknung des Gewebes mit Bildung von Gasbläschen und einer Oxidschicht auf der Elektrodenoberfläche (Kadin et al., 1969).

Unsere Hypothese lautete, dass die transplantierten Stammzellen in den NMDA-läsionierten Versuchstieren besser überleben und sich integrieren könnten. Denn speziell Neurone würden durch die Überstimulation absterben und die übrige Gewebestruktur, wie z. B. vorhandene Blutgefäße und andere Stützgewebszellen, bliebe unversehrt. Somit wäre die Versorgung der transplantierten Zellen besser gewährleistet als in der Elektroläsion.

2.3 Experiment 3: Wachstum transplanteder Stammzellen unter Einfluss von Immunmodulation

Als drittes Experiment untersuchten wir die Einflussnahme von Immunmodulatoren (Minocyclin und Indomethazin) auf das Wachstum und die Integration der Stammzellen. Durch Elektroläsion würde Mikroglia aktiviert werden und eine Abwehrreaktion gegenüber dem beschädigten Gewebe und den anschließend transplantierten Stammzellen beginnen. Mittels bereits in zahlreichen anderen Forschungsarbeiten eingesetzter Immunmodulatoren analysierten wir, inwieweit sich diese in ihrer Wirkung auf aktivierte Mikroglia unterschieden und ob sie somit ein erhöhtes Überleben der Stammzellen ermöglichten.

Unsere Hypothese war es, dass durch die Hemmung von aktivierter Mikroglia die Neuroinflammation mit progressiver Apoptose von Stammzellen und weiteren Neuronen gestoppt werden und der Gewebsschaden insgesamt geringer ausfallen sollte. Zudem wollten wir betrachten, ob es zwischen Minocyclin und Indomethazin ein Unterschied in der Aktivierungsstärke von Mikroglia gibt.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Chirurgisches Nahtmaterial nicht resorbierbar	Johnson & Johnson Intl., Belgien
Injektionsnadel Microliter® Syringes	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Tissue-Tec®	Sakura, Niederlande
96-well-Platte	Peske, Deutschland
6-well-Platte mit Netwell®-Einsetzer, 48-well-Platte	Corning, USA
Superfrost-Plus®-Objektträger	Menzel-Gläser, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland
Parafilm®	Pechiney plastic packaging, Chicago, USA
Neo Clear®	Merck, Deutschland
Neo Mount®	Merck, Deutschland
27 Gauge-Kanüle	BD Drogheda, Irland
1 ml Spritze BD Plastipak®	Becton Dickinson S.A., Spanien

3.2 Software und Geräte

Adobe Photoshop CS	Adobe Systems Inc., USA
Excel XP	Microsoft, USA
Word XP	Microsoft, USA
analySIS	Soft Imaging System, Deutschland
SPSS 12.0 und 18.0	SPSS Inc., USA
Fotokamera ColorView 12	Olympus, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus BX 51	Olympus, Deutschland
Stereoinvestigator	MicroBrightField, USA
Fotokamera HV-C20A	Hitachi Denshi, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus IX 70	Olympus, Deutschland
Stereotaxie-Gerät Small Animal Sterotaxic Instrument	Kopf Instruments, USA
Perfusionspumpe Ismatec Midi-Vario, ISM880	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Deutschland
Schlittenmikrotom LEICA SM 2000R	Leica, Deutschland
Injektionsnadel Microliter Syringes 1µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Schüttelgerät WS-10	Bühler, Deutschland
Vortex-Mixer 2789	Karl Hecht GmbH, Deutschland

3.3 Reagenzien

Anästhetikum für OP:

Anästhesie-Injektionslösung	NaCl 0,9%	20 ml	Braun, Melsungen
	Ketamin 100 mg / ml	7,5 ml	WDT, Gabsen
	Xylazin 2%	8,5 ml	Cp-Pharma, Surodorf
	Acepromazin 13,56 g / ml	0,8 ml	Ceva-Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf

Etwa 0,35-0,4 ml /180-200 g Körpergewicht

NMDA-Injektion:

NMDA-Lösung	NMDA	10 mg / ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
	Phosphatpuffer		

Immunmodulatoren:

Indomethazin		2,5 mg / kg	Flucka, Buchs
Minocyclin		50 mg / kg	Sigma-Aldrich, Steinheim

Perfusion:

Narcoren®	Pentobarbital-Natrium		Dr. med. Spruss, tierärztlicher Dienst der Universität Regensburg
-----------	-----------------------	--	---

Phosphatpuffer (PB) 0,1 M pH 7,4	0,5 M Na ₂ HPO ₄	154,8 ml	Merck, Darmstadt
	0,5 M NaH ₂ PO ₄	45,2 ml auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O auffüllen	

0,9% NaCl-Lösung	NaCl	9 g auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O auffüllen	Merck, Darmstadt
------------------	------	---	------------------

4% Paraformaldehyd (PFA)	(CH ₂ O) _n	40 g auf 1000 ml mit PB auffüllen; pH mit HCl auf 7,4 einstellen	Sigma-Aldrich, Steinheim
--------------------------	----------------------------------	---	--------------------------

30% Sucrose-Lösung	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	150 g	Roth, Karlsruhe
	Phosphatpuffer	auf 500 ml auffüllen	

Kryo-Protektions-Lösung	C ₃ H ₈ O ₃	250 ml	INC, Ohio, USA
	C ₂ H ₆ O ₂	250 ml	
	Phosphatpuffer 0,1M	250 ml	

Natriumphosphatpuffer	KCl	2,0 g/l	Merck, Darmstadt
	KH ₂ PO ₄	2,0 g/l	
	NaCl	80,0 g/l	
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	21,6 g/l	

pH auf 7,4 einstellen

Histologische Färbungen:

Kresylviolett-Histologie:

Kresylviolett-Lösung	0,5 % Kresylviolett	1,25 g	Flucka, Buchs
	bideest. H ₂ O	15 ml	
	C ₂ H ₃ NaO ₂ 1 M	15 ml	
	Acetacid 1 M	85 ml	Merck, Darmstadt

Ethanol	C ₂ H ₅ OH 99%	Verdünnungsreihe mit 30% / 50% / 70% / 96% / 100% durch bideest. H ₂ O	Chemikalienausgabe der Universität Regensburg
---------	--------------------------------------	---	---

ED1-DAB-Immunhistologie:

Trist-T-Puffer	Trist 0,1 M pH 7,4	100 ml	Merck, Darmstadt
	Triton X 0,1%	1 ml	
		auf 1000 ml mit bideest. H ₂ O auffüllen	

Blocklösung	Esel-Serum	3%	Dianova, Hamburg
	Tris-T-Puffer	97%	

Primärantikörper	Maus-anti-ED1	1:300	Serotec, Kidlington, Großbritannien
Sekundärantikörper	Esel-anti-Maus-IgG-Biotin	1:300	Dianova, Hamburg
Negativ-Kontrolle	Maus-IgG	1:120	Sigma-Aldrich, Steinheim

H ₂ O ₂ -Lösung 0,3%	H ₂ O ₂ -Stocklsg. 30%	1:100	Merck, Darmstadt
	Tris 0,1 M pH 7,4		

ABC-HRP-Kit	Tris 0,1 M	5 ml	Vector Laboratories, USA
	Lösung A	2 Tropfen	
	Lösung B	2 Tropfen	

DAB-Kit	Puffer	2 Tropfen	Vector Laboratories, USA
	Peroxid	2 Tropfen	
	DAB-Stock	4 Tropfen	
	bidest. H ₂ O	5 ml	

3.4 Durchführung der Tierversuche

3.4.1 Tierhaltung, Durchführung der Tierversuche, Tierversuchsgenehmigung

Die Tierhaltung und die Vorgehensweise bei den Tierversuchen wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz der Tierversuchskommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg nach Genehmigung durch die Regierung des Bezirkes Oberpfalz durchgeführt.

Der tierexperimentelle Teil wurde in den Laborräumen und dem Tierlabor des Universitätsklinikums, die weiteren histologisch-analytischen Arbeiten in den Laborräumen der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Universität Regensburg in der Zeit zwischen März 2004 bis Oktober 2005 durchgeführt.

3.4.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten gesunde, männliche, adulte Fischer-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200 bis 220 g, die von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden.

3.5 Gewinnung und Züchtung der SVZ-Stammzellen

Adulte Ratten des Typs SD-FUGW mit einem Körpergewicht zwischen 246 und 285 g wurden für die Züchtung der neuralen Stammzellen verwendet. Die Tiere wurden getötet und ihre Gehirne entnommen. Diese wurde in + 4°C D-PBS mit 4%-igem Glucosezusatz überführt und darin gewaschen. Die subventrikuläre Zone wurde frei präpariert und in eine frische D-PBS/Glucose-Mischung (Konzentration wie oben) überführt. Anschließend zentrifugierte man die Gewebeteile bei 800 rpm und + 4°C für 5 Minuten ab. Der Überstand wurde größtenteils entfernt, das restliche Gewebe in eine Petrischale überführt, mit einem Skalpell kleinstmöglich gehackt und zurück in das Gefäß gegeben. Erneut wurde das Gewebe 10 Minuten bei 800

rpm und + 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit einer PPD-Lösung (0,01% Papain [Worthington Biochemicals, England], 0,1% Dispase II [Boehringer Mannheim, Deutschland] 0,01% DNase I [Worthington Biochemicals, England], 12,4 mM MgSO₄ in HBSS (Hanks' gepufferte Salzmischung) ohne Ca²⁺/ Mg²⁺ [PAA, Deutschland]) resuspendiert und für 30-40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei mischte man alle 10 Minuten die Suspension mit einer Pipette. Anschließend wurde die Suspension bei 800 rpm und + 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, das Pellet in D-PBS resuspendiert und mit einer Pipette gut durchgemixt, um die übrigen Gewebereste zu zerkleinern. Die Zellen wurden je einmal mit D-PBS gewaschen und immer wieder gut durchgemischt. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen in Neurobasalmedium [Gibco BRL, Deutschland] resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nun säte man die Zellen (1 x 10⁴ Zellen pro ml) in NB/B27-Medium aus und bebrütete sie bei + 37°C und 5%-iger CO₂-Luft in einem Zellkulturbrutschrank. Im Verlauf von 5-7 Tagen bildeten sich Sphären, die in den folgenden Wochen an Masse und Anzahl zunahmen. Um die Sphären zu passagieren, wurden diese in einem 15 ml-Röhrchen gesammelt und für 10 Minuten bei 800 rpm und + 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, der Rückstand in 100 µl Accutase resuspendiert und bei + 37°C für 10 Minuten inkubiert. Die Sphären wurden kräftig so lange titriert, bis keine Zellhaufen mehr vorhanden waren. Anschließend wurde das Gefäß mit NB/B27-Medium (Neurobasal-Medium mit B27-Zusatz) aufgefüllt und gut durchgemischt. Erneut wurde unter obigen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet im Medium resuspendiert. Man bestimmte die Zellzahl und plattierte neu aus. Es wurden Zellen der Passage 5 für das Experiment über Einfluss von Läsionsart und Anzahl der transplantierten Stammzellen bzw. der Passage 10 für das Experiment über Einfluss von Mikroglia-Inhibitoren auf transplantierte Stammzellen verwendet. (Gewinnung und Kultivierung der Stammzellen nach obigem Protokoll erfolgte durch das Labor von PD L. Aigner, Universitätsklinikum Regensburg.)

3.6 Experiment 1 und 2: Einfluss von Zellanzahl und Läsionsart

In diesem Experiment wurden zwei zu untersuchende Faktoren in einer Tierversuchsreihe zusammengefasst. Zum einen stellte man die Läsionierung mittels Elektroläsion oder NMDA-Injektion mit ihren verschiedenen Auswirkungen auf Empfängergewebe und transplantierten Stammzellen gegenüber. Zum anderen wollte man durch die Transplantation von unterschiedlicher Zellmenge den Einfluss der Stammzellendichte auf Wachstum und Integration genauer untersuchen.

Hierfür wurden 24 adulte Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 220 g in 9 Versuchsgruppen eingeteilt:

Tiere (n)	Art der Läsion	Zellkonzentration des Transplantates (pro 5 µl)
R 1-3	NMDA-Läsion	Transplantat 50.000 Zellen
R 4-6	NMDA-Läsion	Transplantat 500.000 Zellen*
R 7-8	NMDA-Läsion	kein Transplantat
R 9-11	Elektroläsion	Transplantat 50.000 Zellen
R 12-14	Elektroläsion	Transplantat 500.000 Zellen
R 15-16	Elektroläsion	kein Transplantat
R 17-19	keine Läsion	Transplantat 50.000 Zellen
R 20-22	keine Läsion	Transplantat 500.000 Zellen

*Tier R 4 und R 5 erhielten 500.000 Zellen / 10 µl pro Seite

Der Versuchsablauf wurde nach folgendem Zeitplan durchgeführt:

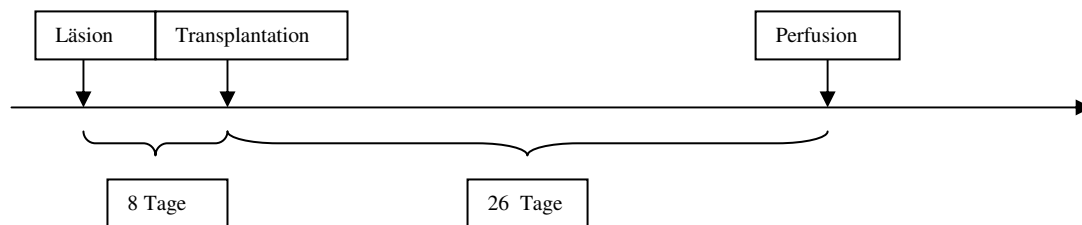


Abb. 4: Zeitlicher Ablauf des Experiments mit verschiedenen Läsionsarten und Transplantatzellmengen. Acht Tage nach bilateraler Läsionierung der Inselrinde mittels Elektrizität oder NMDA-Injektion wurden den Tieren unterschiedliche Mengen an adulten SVZ-Stammzellen bilateral in den Bereich der Inselrinde injiziert. Nach 26 Tagen wurden die Tiere perfundiert, das Gewebe entnommen und zur weiteren Analyse verarbeitet.

3.6.1 Bilaterale elektrische und NMDA-Läsionierung der Inselrinde

Zur Durchführung der Läsionen mittels Elektroläsion bzw. NMDA-Injektion wurden die Versuchstiere (siehe 3.4.2) mittels Anästhesie-Injektionslösung (siehe 3.3) betäubt, in einem Stereotaxie-Rahmen für Kleintiere platziert und der Tierkopf befestigt. Die Kopfhaut wurde sagittal eingeschnitten und die Schädelkalotte freipräpariert, um das Bregma darzustellen. Die Lokalisation der Inselrinde wurde, ausgehend vom Bregma, unter Berücksichtigung der Pa-

parameter (AP: +1,2, ML: +/- 5,3, DV: -6,0) ausgemessen. Mit einem Bohrer eröffnete man die Schädelkalotte oberhalb der Inselrinde. Für die Läsionierung suchte man mit der Spitze der Injektionsnadel bzw. Elektrode die Inselrinde im Bereich der oben genannten stereotaktischen Parameter auf.

3.6.1.1 Elektrische Läsion

Die entsprechenden Ratten wurden, wie oben angegeben, narkotisiert und in den Stereotaxie-Rahmen fixiert. Man suchte mit der Elektrode die Inselrinde entsprechend der oben angegebenen Parameter auf. Nun ließ man für 45 Sekunden eine Stromstärke von 1 mA bei 220 Watt über die Elektrode auf die Inselrinde einwirken.

3.6.1.2 NMDA-Injektion

Für die NMDA-Läsion wurden die Versuchstiere, wie oben beschrieben, fixiert. Man suchte die Inselrinde mit der Injektionsnadel auf und injizierte über einen Zeitraum von 4 Minuten langsam 0,8 µl einer 10 mg / ml NMDA-Lösung. Die Injektionsnadel wurde für weitere 3 Minuten im Gewebe belassen, um einen Rückfluss der Lösung aufgrund des erhöhten Gewebedruckes zu vermeiden.

Die Elektrode bzw. die Injektionsnadel wurde vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die kontralaterale Seite nach der gleichen Vorgehensweise behandelt. Die Kopfhaut wurde per Naht verschlossen.

3.6.2. Transplantation unterschiedlicher Zellkonzentrationen

Acht Tage nach der Läsionierung wurde die Stammzell-Transplantation durchgeführt. Man positionierte die Tiere entsprechend der Läsionierung im Stereotaxie-Rahmen. Die Spitze einer mit Stammzellsuspension abgefüllten Injektionsnadel wurde identisch zu den Parametern, die für die Läsionierung verwendet worden waren, positioniert. Es wurden je drei Tieren aus der Gruppe mit NMDA-Läsion und elektrolytischer Läsion bilateral je 50.000 Zellen / 5 µl von den kultivierten Stammzellen aus der subventrikulären Zone transplantiert. Auf die gleiche Weise wurden ebenso drei Tieren aus den beiden Läsionsgruppen bilateral jeweils 500.000 Zellen / 5 µl transplantiert (Tier R 4 und R 5 erhielten 500.000 Zellen / 10 µl). Als

Kontrolle für die verschiedenen Läsionsarten erhielten die übrigen zwei Tiere der jeweiligen Läsionsgruppe keine Stammzellen. Um eine Aussage bezüglich des Einflusses der Läsionierung auf das Empfängerewebe und die Transplantatzellen machen zu können, wurde eine Kontrollgruppe aus acht Tieren mit intakter Inselrinde aufgestellt. Von diesen Ratten wurden jeweils drei Tiere bilateral mit 50.000 Zellen / 5 µl und drei Tiere mit 500.000 Zellen / 5 µl transplantiert, zwei Tiere wurden weder läsioniert noch transplantiert. Die Injektionsnadel wurde nach Abschluss der Injektion für 3 Minuten im Gewebe belassen, um ein Zurückfließen der Transplantatflüssigkeit zu verhindern. Die Wunde wurde mit Naht verschlossen.

Am 26. Tag nach der Transplantation beendete man das Experiment und die Tiere wurden, wie unter 3.8 geschildert, perfundiert.

3.7 Experiment 3: Wachstum von transplantierten Stammzellen unter Immunmodulation

Um die Auswirkung der immunmodulierenden Medikamente Minocyclin und Indomethazin auf das Wachstum von transplantierten Stammzellen zu analysieren, wurden 20 adulte Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 200 g in 9 verschiedene Versuchsgruppen wie folgt eingeteilt:

Tiere (n)	Bilaterale Elektro-läsion	Transplantation von Stammzellen	Immunmodulation
R 1-2	+	–	Minocyclin
R 3-4	+	+	Minocyclin
R 5 + 7*	+	–	Indomethazin
R 6 + 8	+	+	Indomethazin
R 9-10	+	–	Puffer
R 11-12	+	+	Puffer
R 13-15	–	+	Minocyclin
R 16-18	–	+	Indomethazin
R 19-20	–	+	Puffer

* Tier R 7 ist am 6. Tag nach der Elektroläsion gestorben

Die Läsionierung, Transplantation, Verabreichung der Medikamente sowie Perfusion liefen zeitlich wie folgt ab:

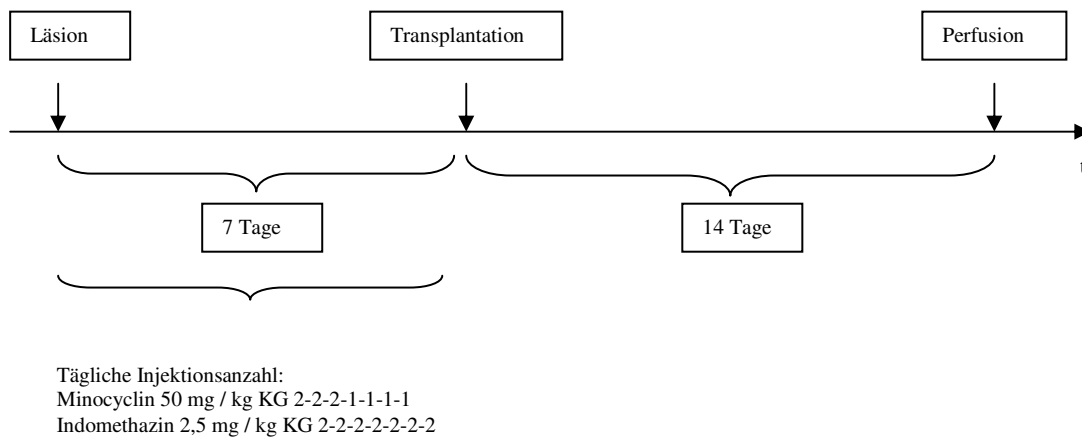


Abb. 5: Zeitlicher Ablauf des Experiments mit Einsatz von Mikroglia-inhibitorischen Medikamenten. Nach bilateraler elektrischer Läsion der Inselrinde wurden läsierten Tieren und Kontrolltieren Minocyclin entsprechend des täglichen individuellen Körpergewichts der Tiere an den ersten drei Tagen mit Beginn unmittelbar nach der Läsionierung zweimal täglich (vor- und nachmittags), an den folgenden vier Tagen jeweils einmal täglich injiziert. Indomethazin wurde ebenso direkt nach der Läsionierung entsprechend des täglichen Körpergewichts den läsierten Tieren zweimal täglich verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend täglich Puffer verabreicht.

3.7.1 Bilaterale elektrische Läsionierung

Die Tiere 1-12 wurden, wie unter 3.6.1.1 erläutert, bilateral elektrisch läsiert (stereotaktische Parameter: AP: +1,2, ML: +/-5,3, DV: -6,5).

3.7.2 Medikamentenbehandlung

Um analysieren zu können, ob und in welchem Ausmaß aktivierte Mikroglia Einfluss auf das Wachstum und die Integration von transplantierten Stammzellen haben, wurden zwei verschiedene Immunmodulatoren eingesetzt. Vor jeder Injektion wurden die Tiere zur Feststellung des aktuellen Körpergewichtes und zur Bestimmung der individuellen Wirkstoffmenge gewogen. Die erste Injektion wurde am Tag der Elektroläsion verabreicht.

Die Kontrolltiere erhielten entsprechend ihres täglichen Körpergewichtes einmal täglich Puffer injiziert.

3.7.2.1 Minocyclin

Der Wirkstoff Minocyclin wurde in der Konzentration von 50 mg / kg Körpergewicht in den ersten drei Tagen nach der Elektroläsion je zweimal täglich (vor- und nachmittags), vom vierten bis siebten Tag nach der Elektroläsion einmal täglich (vormittags) i. p. injiziert.

3.7.2.2 Indomethazin

Indomethazin wurde mit einer Dosierung von 2,5 mg / kg Körpergewicht in den sieben Tagen nach der Elektroläsion jeweils zweimal täglich (vor- und nachmittags) i. p. verabreicht.

3.7.3 Transplantation

Am Tag nach der letzten Injektion der Immunmodulatoren wurden den entsprechenden Tiergruppen Stammzellen in den Bereich der Inselrinde transplantiert. Dazu wurden adulte Stammzellen, wie unter 3.5 erläutert, verwendet.

Die Ratten wurden auf gleiche Weise wie bei der Elektroläsion narkotisiert, in das Stereotaxie-Instrument fixiert und die Kopfhautnaht eröffnet. Mittels einer Injektionsnadel suchte man entsprechend der Parameter die Inselrinde (siehe 3.7.1) auf. Nun injizierte man langsam eine Million Zellen in jede Gehirnhälfte. Da sich aufgrund der Injektion der Gewebedruck erhöhte, beließ man die Injektionsnadel für weitere 3 Minuten im Gewebe und zog sie danach vorsichtig zurück, um einen Rückfluss der Zellsuspension zu vermeiden. Anschließend wurde die Kopfhaut per Naht verschlossen.

Schließlich wurde am 14. Tag nach der Transplantation das Experiment durch Perfusion der Versuchstiere, wie unter 3.8 beschrieben, beendet.

3.8 Perfusion der Tiere, Gewebefixation und Entnahme der Gehirne

Die Perfusion der Tiere sowie die Entnahme der Gehirne des Experimentes über Einfluss von Läsionsart und Anzahl an transplantierten Stammzellen fanden am 26. Tag nach der Transplantation statt.

Für die Tiergruppen des Experimentes über Einfluss von Mikroglia-Inhibitoren auf transplantierte Stammzellen wurde die Perfusion am 14. Tag nach der Transplantation der Stammzellen durchgeführt.

Die Perfusion unterlag bei beiden Experimenten dem gleichen Protokoll. Die Tiere wurden zuerst gewogen und anschließend durch i. p. Injektion von Narcoren® (Pentobarbital-Natrium, Dr. Spruss, Universität Regensburg) anästhesiert. Nachdem die Tiere keine Schmerzreaktion mehr zeigten, wurde das Sternum freigelegt und entnommen sowie die Thymusdrüse entfernt. Mit einer Klemme umfasste man das Herz quer über die Ventrikel, klemmte die Herzspitze ab und schnitt längs zum Herzen ein. Über diese Öffnung wurde eine stumpfe Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt, bis in die Aorta vorgeschoben und mit der Klemme verschlossen. Als Ablauf der Perfusionsflüssigkeit wurde das rechte Herzhorn eingeschnitten. Die Perfusion wurde mit auf Eis gekühlter 0,9%-igen NaCl-Lösung über ein Pumpsystem für 5-8 Minuten begonnen, um sämtliche Blutbestandteile aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend wurde eine auf Eis gekühlte 4%-ige Paraformaldehyd in 0,1 M PB – Lösung (PFA) als Fixierflüssigkeit für 10-15 Minuten infundiert. Davon wurde pro Tier ca. 100-150 ml verbraucht.

Zuletzt wurden die Gehirne zusammen mit dem oberen Rückenmark frei präpariert, abgetrennt und über Nacht in 4%-iger PFA-Lösung nachfixiert. Am Folgetag wurden sie in 30%-ige Sucroslösung überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei + 4°C gelagert.

3.9 Aufbereitung der Gehirne mittels Kryoschnittverfahren

Zur weiteren Aufarbeitung der fixierten Gehirne fertigte man von diesen in gefrorenem Zustand koronare Schnitte auf einem Schlittenmikrotom an. Hierzu wurde ein Kupferaufsatz am Mikrotom befestigt und mit Trockeneis gekühlt. Auf diesen trug man zunächst Tissue tec® auf und setzte das von Medulla oblongata und Bulbus Olfactorius abgetrennte Gehirn darauf. Nachdem das Gehirngewebe durch eine ca. einminütige Bedeckung mit Trockeneis im gefrorenen Zustand vorlag, konnten 30 µm dicke koronare Schnitte angefertigt werden. Es wurde darauf geachtet, dass der erste und letzte aufzubewahrende Schnitt aus „in sano“ Gewebe bestand. Die Schnitte wurden einzeln in mit Kryoprotektionslösung befüllten 96-well-Platten bei + 4° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.10 Histologische Verfahren

3.10.1 Kresylviolett-(CV)-Färbung

Zur Erlangung einer Übersicht über Ausdehnung, Lokalisation und Morphologie der Stammzelltransplantate und Läsionen wurde eine Kresylviolett-(CV)-Färbung angefertigt. Der basische Farbstoff lagert sich an Nukleinsäuren des rauen endoplasmatischen Retikulums in den Nervenzellen (sogenannte „Nissl-Schollen“) und stellt somit die Zellkörper von Nervenzellen dar (Mulisch und Welsch, 2010). Zunächst wurde jeder 8. Schnitt aus der Kryoprotektionslösung in bidest. H₂O gegeben und der Reihenfolge entsprechend auf Superfrost-Plus®-Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur über Nacht angetrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 20 Minuten in 0,5%-ige CV-Lösung inkubiert und in warmen bidest. H₂O gespült. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30% - 50% - 70% - 96% - 96% - 100% - 100%; jeweils 1 Minute) bis zum Xylol-Ersatz Neo Clear® (2 x 15 Minuten) dehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit Neo Mount® eingedeckelt.

3.10.2 Indirekte immunhistologische Färbung von ED1-Antigenen

Um den Einfluss von aktivierter Mikroglia auf das Wachstum und die Integration der transplantierten Stammzellen analysieren zu können, führte man eine „free floating“ immunhistologische ED1-Färbung durch. Hierbei wurde das für aktivierte Makrophagen typische lysosomale Antigen CD 68 mit dem spezifischen Antikörper ED1 markiert (Damoiseaux et al., 1994). Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers und einer Peroxidase-vermittelten Farbreaktion stellte man diese Zellen visuell dar.

Entsprechend eines Abstandes von 360 µm wurde jeder 12. Schnitt pro Tier verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein einzelner Schnitt eines beliebigen Tieres verwendet. Die einzelnen Färbe- und Waschschrte wurden in 48-well- bzw. 6-well-Platten durchgeführt. Die Überführung der Schnitte in die verschiedenen Lösungen wurde mittels Netwells®, kleiner Kunststoffbehälter mit netzartigem Boden, sowie eines Aquarellmalpinsels erleichtert. Sämtliche Wasch- und Inkubationsvorgänge wurden auf einem Schüttelgerät durchgeführt, sodass sich die Schnitte nicht verklebten und die Antikörper gleichmäßig verteilt wurden.

Die freischwimmenden Schnitte wurden zunächst aus der Kryo-Protektions-Lösung in Tris-T-Puffer überführt und mehrmals gewaschen, um nicht gebundene oder unspezifische Bindungen zu neutralisieren.

Nun wurden die Schnitte für 45 Minuten in Blocklösung inkubiert, um ein ausschließlich spezifisches Binden der Antikörper an das Gewebe zu ermöglichen und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Eine Lösung des Primär-Antikörpers sowohl für die Versuchstiere (Maus-anti-ED1-IgG, 1: 300) als auch für die Negativkontrolle (Maus-IgG, 1:120) wurde hergestellt. Man führte die Schnitte in diese über, versiegelte die Wellplatten mit Parafilm und ließ sie über Nacht bei + 4°C auf dem Schüttler inkubieren. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst mit Tris-T-Puffer mehrmals gewaschen, um nicht gebundene Primärimmungglobuline vom Gewebe zu lösen. Man stellte eine Lösung mit dem Biotin markierten Sekundär-Antikörper (Esel-anti-Maus-IgG-Biotin, 1:300) her. Die Schnitte wurden dahin überführt und für 2 Stunden inkubiert. Es schlossen sich mehrere Waschvorgänge in Tris-T-Puffer zur Eliminierung von überschüssigen Antikörpern an. Als Nächstes galt es, die im Gewebe verbliebene endogene Peroxidase, ein unter anderem in Nervenzellen vorkommendes Enzym, das mit dem Detektionssystem reagieren und zu falsch positiven Ergebnisse führen könnte, zu blockieren. Hierzu wurden die Schnitte in eine 0,3%-ige H₂O₂-Lösung für 30 Minuten gegeben und anschließend wieder in Tris-T-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in den ABC-HRP-Kit, der 1 Stunde vor Gebrauch aus 5 ml Tris-T-Puffer, 2 Tropfen Lösung A und 2 Tropfen Lösung B hergestellt worden war, überführt und für 2 Stunden inkubiert. Hierbei entstand eine Verbindung zwischen dem Biotin des Sekundärantikörpers und dem Avidin-Meerrettichperoxidase-Komplex.

Nach mehrfachem Waschen in Tris-T-Puffer wurden die Schnitte in den DAB-Kit, der das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin enthält, zugegeben und für ca. sieben Minuten inkubiert. Das zunächst leicht bräunliche DAB reagierte in Anwesenheit der Meerrettichperoxidase zu seinem braunen Farbprodukt. Somit wurden die ED1-Antigene hochselektiv für die weiteren lichtmikroskopischen Untersuchungen dargestellt. Die Schnitte wurden danach zweimal in Tris-T-Puffer gewaschen. Anschließend folgte das Aufziehen der einzelnen Schnitte auf Superfrost-Plus-Objektträger® und das Eindeckeln mit Neo Mount®.

3.11 Lichtmikroskopische Auswertung

Zur Analyse von Größe, Lokalisation und Morphologie der Transplantate wurden die CV-gefärbten Schnitte herangezogen. Um eine vergleichbare Ausgangsbasis der zu erhebenden Werte zu schaffen, wurden zunächst Kriterien bezüglich Lokalisation und Morphologie der zu messenden Transplantate oder Läsionen aufgestellt. Bewertet wurden Transplantate und Läsionsstellen im Bereich des Cortex. Nicht berücksichtigt wurden Areale, die das Striatum betrafen, da man von unterschiedlichen Umgebungsbedingungen für die transplantierten Stammzellen und folglich von einer verschiedenen Differenzierung im Bereich des Striatums ausgehen musste. Ebenso wurden Transplantate bzw. Läsionen an der Oberfläche des Gehirngewebes nicht zur Auswertung mit einbezogen, da es sich hierbei um mögliche Streuartefakte oder läsionsbedingte Artefakte im Bereich des Einstichkanals handeln konnte.

Durch das Schneiden des Gewebes in gefrorenem Zustand und die weitere Bearbeitung der Schnitte nach der „free-floating“- Methode, aber auch wegen der instabilen Gewebestruktur, lösten sich zum Teil Transplantate und läsioniertes, nekrotisches Gewebe heraus und hinterließen entsprechend gewebefreie Stellen. Diese Areale wurden unter Berücksichtigung der Grenze zu Striatum und Oberfläche separat gemessen und in den einzelnen Berechnungen mit aufgeführt. Hinsichtlich der Morphologie teilte man die Transplantate in festes oder locker angeordnetes Gewebe und Bereiche mit fehlendem Gewebe ein. Festes Gewebe zeigte eine ähnlich hohe Zellanzahl und Struktur wie natives Gewebe. Somit war hier von einer guten Integration der transplantierten Zellen auszugehen. Lockeres Gewebe war wabenartig mit erweiterten Interzellularräumen aufgebaut und wirkte instabil. Die Integration in das Empfängergewebe war nicht eindeutig zu beurteilen. Es war jedoch anzunehmen, dass sie schlechter als beim festen Transplantat war. Fehlendes Gewebe wurde verursacht durch Gewebeuntergang nach Läsion oder im Rahmen der Verarbeitung des Materials (z. B. Schneiden, Färben, Waschvorgänge).

Es wurden alle gefärbte Schnitte eines Tieres (ca. 10-12 pro Tier) unter dem Lichtmikroskop in vierfacher Vergrößerung untersucht. Jede Hirnhemisphäre wurde einzeln mittels der Farbkamera in vierfacher Vergrößerung als digitales Farbfoto aufgenommen. Entsprechend der obigen Kriterien maß man die Bereiche mit Transplantate, Läsionsgebieten und fehlendem Gewebe aus.

Man fertigte Excel-Tabellen an, worin Schnittnummer, Morphologie sowie Größe und Umfang der Läsionen bzw. Transplantate vermerkt wurden. Anschließend berechnete man mit Hilfe des Programms Excel die Flächen in μm^2 für beide Gehirnhemisphären jeweils für jeden einzelnen Schnitt (im Abstand von $360\ \mu\text{m}$), die durchschnittliche Fläche und Standardabweichung der einzelnen Vergleichsgruppen und stellte sie graphisch gegenüber.

3.12 Stereologie

Die quantitative Auswertung der immunhistologischen ED1-Präparate wurde, unterstützt von einem Stereologie-Programm, vorgenommen. Hierbei handelt es sich um eine Technik, histologische Schnitte dreidimensional durchmustern zu können. Bei dem Stereologie-Mikroskop konnte man den Brennpunkt in verschiedene Ebenen verschieben. Dadurch erfasste man zusätzliche Bereiche des Gewebes und konnte die Auswertungen wie z. B. von Häufigkeit und Verteilung der markierten Zellen noch genauer als im herkömmlichen Lichtmikroskop erfassen. Diese Methode brachte unsere Auswertung hinsichtlich Verteilung und Häufigkeit von ED1-positiven Zellen noch näher an die Realität.

Um die Analyse auf eine geringere Schnittanzahl einzuschränken und trotzdem das gesamte Transplantat- bzw. Läsionsareal beurteilen zu können, wählte man diejenigen Schnitte aus, die in den drei Bereichen (1) Interaural + 11,70 bis + 10,70mm / Bregma + 2,70 bis + 1,70mm, (2) Interaural + 10,2 bis + 9,7mm / Bregma +1,2 bis + 0,7mm und (3) Interaural + 9,2 bis + 8,7mm / Bregma + 0,2 bis - 0,3mm (gemäß der stereotaktischen Koordinaten aus dem Katalog von Paxinos und Watson, 1998) lagen und bezeichnete sie mit „anterior“, „medial“ und „posterior“. Die einzelnen Schnitte wurden in zehnfacher Vergrößerung entsprechend den Kriterien, die bei den Messungen in der CV-Färbung angewandt wurden, ausgewertet.

Zur Quantifizierung der ED1-positiven Zellen wurden die Transplantate in eine „periphere Zone“ und eine „zentrale Zone“ eingeteilt. Die periphere Zone beinhaltete sämtliche eindeutig markierte Zellen, die im näheren, das Transplantat oder die Läsion umgebenden Gewebe lagen. Die zentrale Zone grenzte unmittelbar an das Transplantat oder an die Läsion an. In jeder Zone wurden jeweils vier Gesichtsfelder ausgewählt, die die Zellverteilung repräsentativ für die jeweilige Zone widerspiegelte. Bei einer zu geringen Zonenfläche wurden drei Felder gezählt. Das einzelne Gesichtsfeld entsprach einer Fläche von ca. $9200\ \mu\text{m}^2$. Man teilte die

gezählten Zellen in „große Zellen“ und „kleine Zellen“ ein. „Große Zellen“ besaßen klar erkennbare Zellgrenzen mit einem eindeutigen Zellkörper. Sie unterschieden sich hinsichtlich der Größe des Zellkörpers klar von den „kleinen Zellen“. Diese letzteren entsprachen Makrophagen, die aufgrund der Schnittdicke von 30 μm nur teilweise angeschnitten bzw. aufgrund der geringeren Aktivierung schwächer gefärbt waren (Dijkstra et al., 1985; Damoiseaux et al., 1994). Die Fläche der jeweiligen Zone wurde markiert. Die Zellanzahl der einzelnen Gesichtsfelder pro Zone wurde auf die Gesamtfläche der einzelnen Zonen berechnet.

Die auf die Gesamtfläche der einzelnen Zonen (periphere und zentrale Zone) umgerechneten Zellen (Zellen / μm^2) wurden in Excel-Tabellen zusammengestellt. Dabei unterschied man zwischen der topographischen Lokalisation des ausgewerteten Areals (anterior, medial, posterior, rechte und linke Gehirnhälfte), Zellgröße (klein, groß) und Zone (periphere Zone, zentrale Zone). Schließlich fasste man die in den drei topographischen Bereichen (anterior + medial + posterior) ermittelten Zellen pro Tier zusammen. Es wurde mittels Excel-Software Gruppendurchschnitt und Standardabweichung berechnet und graphisch veranschaulicht.

3.13 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung mittels computergestützten SPSS-Programms dienten die Daten der CV- und ED1-Färbungen. Nach eingehender Analyse der Ergebnisse in der ED1-Färbung entschied man sich, die Daten der „großen Zellen“, die als eindeutig markierte Zellen gewertet worden sind, in den einzelnen topographischen Loci (anterior, medial, posterior) sowie in Summe der drei Loci (anterior + medial + posterior) als Grundlage der Signifikanzberechnung zu verwenden.

Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse der verschiedenen Experimente zu berechnen, benutzte man den Mann-Whitney-U-Test. Dies ist eine nicht-parametrische Testmethode für unabhängige Stichproben aus nicht-Gauß'schen Mengen, da man aufgrund der geringen Versuchstieranzahl von einer Abweichung von der Gauß'schen Normalverteilung auszugehen hatte. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) sind Unterschiede als signifikant betrachtet worden. Aufgrund der geringen Fallzahlen ($1 \leq n \leq 3$) ist selten das Signifikanz-Niveau erreicht worden. Die Testergebnisse, die $0,05 \leq p < 0,1$, also eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 10 %, erzielten, wurden als „Trend“ oder „tendenziell different“ eingestuft.

4. RESULTATE

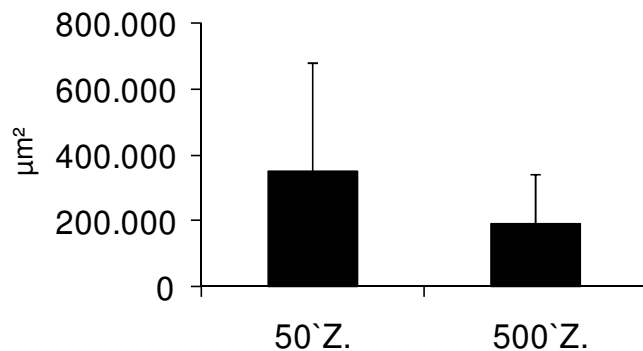
4.1 Anzahl der Zellen

Im ersten Experiment wurde der Einfluss unterschiedlicher Anzahl an transplantierten Stammzellen auf ihr Wachstum und Integrationsverhalten analysiert. Die Tiere erhielten nach Elektroläsion oder NMDA-Läsion bilateral im Bereich der Inselrinde 50.000 Zellen / 5 μ l bzw. 500.000 Zellen / 5 μ l adulte SVZ-Stammzellen. Es wurden Gruppen mit Transplantation in intakte Inselrinde, Transplantation nach NMDA-Läsion und Elektroläsion betrachtet.

4.1.1 Wachstums- und Integrationsanalyse anhand der CV-Färbung

Die CV-gefärbten Schnittpräparate wurden auf Größe und Morphologie von Läsion und Transplantat hin lichtmikroskopisch untersucht.

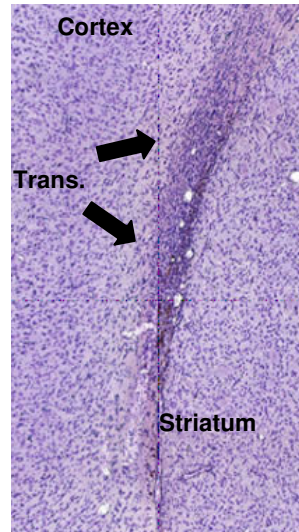
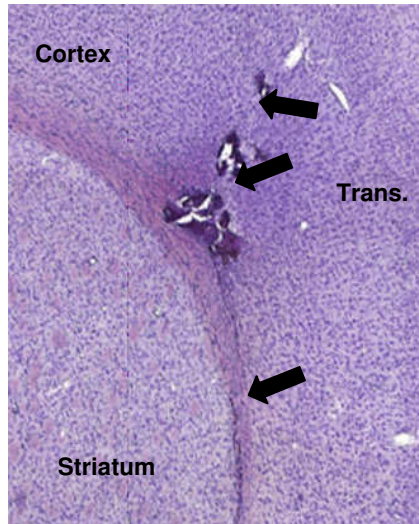
Transplantationsfläche nach Transplantation unterschiedlicher Zellanzahl in intakte Inselrinde:



Gruppe	festes Trans. (µm²)	lockeres Trans. (µm²)	fehlendes Trans. (µm²)	gesamtes Trans. (µm²)	n	Signifikanz
50'Z.	23.021	101.713	67.784	192.518	3	n. s.
	194.241	0	0	194.241		
	0	731.966	32.450	764.415		
	203.416	0	0	203.416		
500'Z.	32.202	0	0	32.202	3	
	336.822	0	0	336.822		

Abb. 6 und Tab. 1: Hinsichtlich der unterschiedlichen Zellmenge, welche in intakte Inselrinde transplantiert wurde, zeigte die Gruppe mit 50.000 Zellen durchschnittlich eine größere Trans-

plantatfläche (Abb., fest + locker) auf als die Gruppe mit 500.000 Zellen (n. s.). Hauptsächlich dafür verantwortlich war die große Fläche mit lockerem Gewebe von Tier R 18 aus der Gruppe mit 50.000 Zellen. In der Gruppe mit 500.000 Zellen war ausschließlich festes Transplantat zu finden. Daher waren Unterschiede im Bereich mit festem ($p = 0,127$), lockerem und fehlendem ($p = 0,121$) Transplantat zu erkennen.

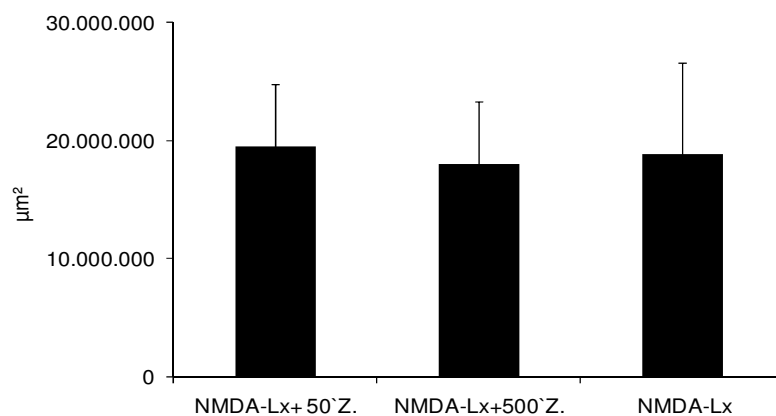


a) Intakt + 50.000 Z.

b) Intakt + 500.000 Z.

Abb. 7,8: Es zeigen a) und b) intaktes Gehirngewebe mit unterschiedlicher Anzahl an transplantierten Zellen. Die Transplantate besitzen ein kompaktes Aussehen.

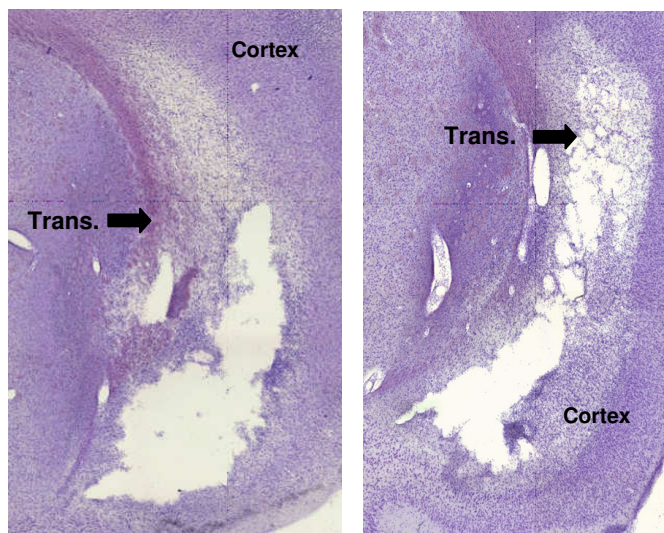
Transplantatfläche unterschiedlicher transplantierte Zellanzahl nach NMDA-Läsion bzw. Läsionsfläche:



Gruppe	festes Trans. (μm^2)	lockeres Trans. (μm^2)	fehlendes Trans. (μm^2)	gesamtes Trans./ Läsion(μm^2)	n	Signifikanz
	0	13.531.350	12.445.133	25.976.483		
NMDA- Lx+ 50`Z.	0	23.578.608	2.869.454	26.448.062		
	0	21.340.718	9.766.871	31.107.589	3	n. s.
	0	20.576.400	2.578.142	23.154.542		
NMDA- Lx+500`Z.	74.426	21.418.315	6.627.905	28.120.646		
	0	11.931.566	796.148	12.727.716	3	
	0	0	0	24.311.083		
NMDA-Lx	0	0	0	13.509.589	2	

Abb. 9 und Tab. 2:

In der Abbildung wurde die Größe der NMDA-Läsion den transplantierten Gruppen mit vorhergehender NMDA-Läsion (festes + lockeres Transplantat) gegenübergestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den transplantierten Gruppen ($p = 0,127$ festes Transplantat, da lediglich im Tier R 5 vorhanden). Die Gruppe NMDA-Lx + 50.000 Zellen zeigte mit $p = 0,083$ eine tendenziell größere Gesamtfläche (festes + lockeres + fehlendes Gewebe) gegenüber der Kontrollgruppe auf. In der NMDA-Gruppe wurde insgesamt kaum kompaktes Transplantatgewebe gefunden.

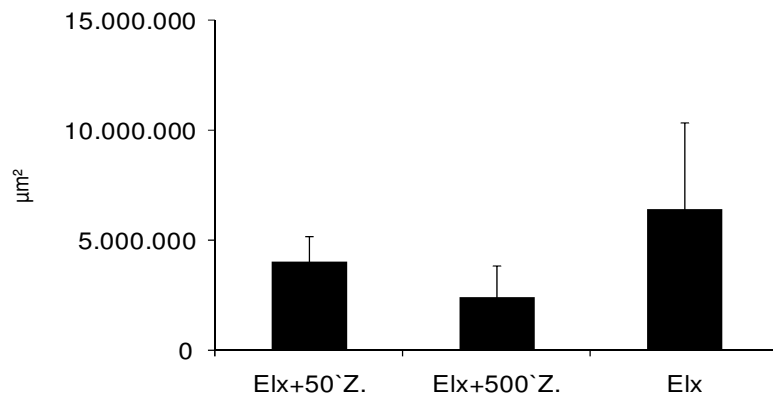


c) NMDA-Lx + 50.000 Zellen

d) NMDA-Lx + 500.000 Zellen

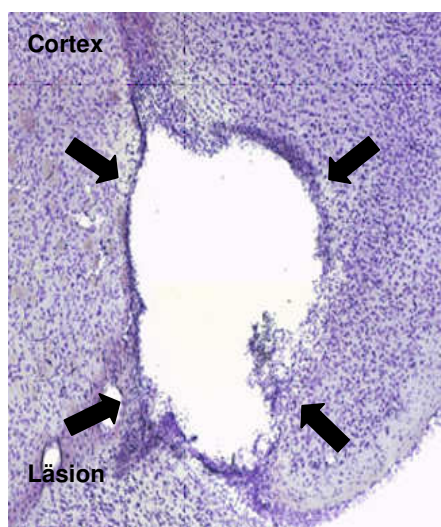
Abb. 10, 11: Abbildungen c) und d) zeigen NMDA-läsionierte Hemisphären mit unterschiedlicher Anzahl an transplantierten Zellen.

Transplantatfläche unterschiedlicher transplantierte Zellanzahl nach Elektroläsion bzw. Läsionsfläche:

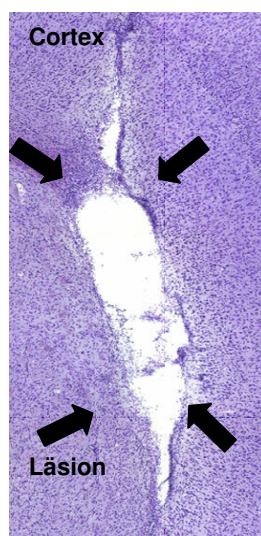


Gruppe	festes Trans. (µm²)	lockeres Trans. (µm²)	fehlendes Trans. (µm²)	gesamtes Trans./ Läsion (µm²)	n	Signifikanz
ELx+50`Z.	30.412	2.750.566	3.471.886	6.252.864	3	n. s.
	0	5.170.834	4.878.138	10.048.972		
	87.500	3.983.141	3.591.554	7.662.194		
ELx+500`Z.	0	2.021.202	8.243.807	10.265.008	3	n. s.
	0	4.015.727	545.431	4.561.158		
	0	1.124.356	1.378.143	2.564.051		
ELx	0	0	0	3.641.615	2	
	0	0	0	9.221.307		

Abb. 12 und Tab. 3: Bildliche Gegenüberstellung der Transplantatfläche (fest + locker) der Versuchsgruppen mit ELx und Kontrollgruppe. Im Größenvergleich vom Transplantat mit fester + lockerer Eigenschaft führte die Gruppe ELx + 50.000 Zellen mit $p = 0,127$ und beim Transplantat mit fester Morphologie mit $p = 0,121$ gegenüber der Gruppe mit 500.000 Zellen. Insgesamt war kaum festes Transplantat zu erkennen (festes Transplantat nur in R 9 und R 11), viel Gewebe verloren gegangen und konnte nicht analysiert werden (siehe Tabelle).



e) Elektroläsion + 50.000 Z.



f) Elektroläsion + 500.000 Z.

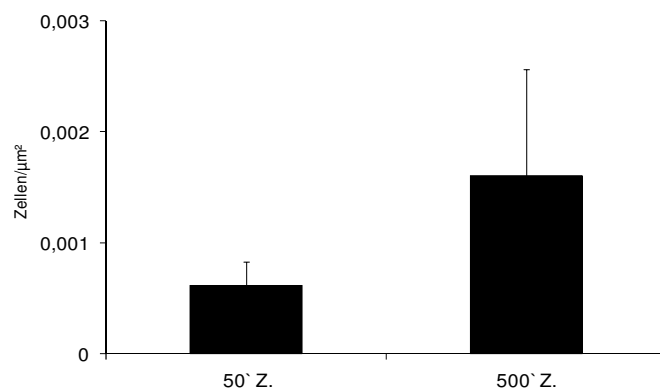
Abb. 13, 14: In Abbildungen e) und f) sind elektroläsionierte, transplantierte Schnitte mit großen Flächen an verloren gegangenem Gewebe dargestellt.

4.1.2 Makrophagen-Aktivität anhand Zählung ED1-positiver Zellen

Anhand der Anzahl an aktivierten Makrophagen peripher sowie zentral um die Transplantate und Läsionen wurde die Entzündungsreaktion in den drei Gruppen untersucht.

4.1.2.1 Periphere Zone

ED1-positive Zellen in intakter Inselrinde nach Transplantation in der peripheren Zone:



Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
50' Z.	0,000435	0,000616	0,000208	3	n. s.
	0,000842				
	0,000571				
500' Z.	0,000625	0,001603	0,000960	3	
	0,001639				
	0,002543				

Abb. 15 und Tab. 4: Zwischen den verschiedenen transplantierten Zellmengen (anterior, medial, posterior zusammengefasst) wurde in der Gruppe mit 500.000 Zellen mehr markierte ED1-Zellen im peripheren Läsionsareal gefunden ($p = 0,127$).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
50' Z.	0,000408	0,000217	0,000205	3	n. s.
	0				
	0,000245				
500' Z.	0,000163	0,000054	0,000094	3	
	0				
	0				

Medial periphere Zone

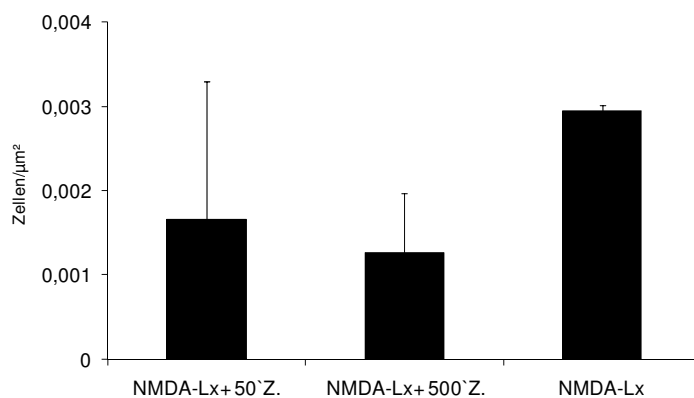
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
50` Z.	0,000027	0,000272	0,000222	3	n. s.
	0,000462				
	0,000326				
500` Z.	0,000462	0,001371	0,000809	3	
	0,001639				
	0,002011				

Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
50` Z.	0	0,000127	0,00022	3	n. s.
	0,000380				
	0				
500` Z.	0	0,000178	0,000308	3	
	0				
	0,000533				

Tab. 5-7: Zur genaueren Einschätzung der räumlichen Verteilung der markierten Makrophagen (anterior, medial, posterior) wurden im medialen Abschnitt der Gruppe 500.000 Zellen mehr markierte Zellen gefunden ($p = 0,077$). Markierte Zellen traten bei allen Tieren überwiegend im medialen Bereich auf, im anterioren und posterioren Abschnitt nur in vereinzelten Tieren.

ED1-positive Zellen nach NMDA-Läsion mit unterschiedlicher transplantierte Zellmenge in der peripheren Zone:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50` Z.	0,003460	0,001661	0,001633	3	n. s.
	0,001250				
	0,000272				
NMDA-Lx+ 500` Z.	0,000598	0,001265	0,000699	3	n. s.
	0,001205				
	0,001993				
NMDA-Lx	0,002889	0,002939	0,000070	2	
	0,002989				

Abb. 16 und Tab. 8:

Abbildung der ED1-positiven Zellen (anterior, medial und posterior zusammengefasst). In der Kontrollgruppe wurden annähernd doppelt so viele ED1-positive Zellen gefunden wie in den beiden transplantierten Gruppen ($p = 0,083$). Zwischen den beiden transplantierten Gruppen ergab sich kein wesentlicher Unterschied.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,002011	0,000978	0,000943	3	n. s.
	0,000761				
	0,000163				
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,000245	0,000513	0,000361	3	n. s.
	0,000924				
	0,000371				
NMDA-Lx	0,001884	0,001472	0,000583	2	
	0,001060				

Medial periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,001449	0,000673	0,000702	3	n. s.
	0,000489				
	0,000082				
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,000217	0,000314	0,000241	3	n. s.
	0,000136				
	0,000589				
NMDA-Lx	0,000734	0,000910	0,000250	2	
	0,001087				

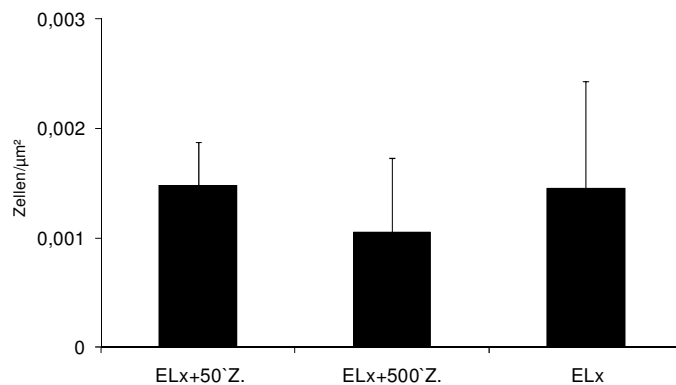
Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0	0,000009	0,000016		0,046
	0				
	0,000027				
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,000136	0,000438	0,000515		n. s.
	0,000145				
	0,001033				
NMDA-Lx	0,000272	0,000557	0,000404		
	0,000842				

Tab. 9-11:

Im anterioren und medialen Abschnitt zeigten sich in der Kontrollgruppe tendenziell signifikant mehr markierte Zellen als in der NMDA-Gruppe mit 500.000 Zellen ($p = 0,083$). Im posterioren Bereich hatte die Gruppe mit 50.000 Zellen signifikant weniger markierte Makrophagen als die Gruppe mit 500.000 Zellen ($p = 0,046$) und deutlich weniger als die Kontrollgruppe ($p = 0,076$). Insgesamt wurden bei allen Tieren (bis auf Tier R 1 und R 2 aus der NMDA-Gruppe mit 50.000 Zellen) in allen Abschnitten markierte ED1-positive Zellen gewertet.

ED1-positive Zellen nach Elektroläsion mit unterschiedlicher transplantierte Zellmenge in der peripheren Zone:



Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+50`Z.	0,001060	0,001478	0,000395	3	n. s.
	0,001531				
	0,001845				
ELx+500`Z.	0,000978	0,001051	0,000682	3	n. s.
	0,000408				
	0,001766				
ELx	0,002147	0,001454	0,000980	2	
	0,000761				

Abb. 17 und Tab. 12: Während sich die Gruppe mit der Transplantation von 50.000 Zellen unwesentlich von der Kontrollgruppe unterschied, wies die Gruppe mit 500.000 Zellen durchschnittlich weniger aktivierte Makrophagen in der peripheren Zone auf (anterior, medial und posterior zusammengefasst). Eine signifikante oder tendenzielle Differenz wurde nicht ermittelt.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+50`Z.	0,000571	0,000420	0,000159	3	n. s.
	0,000435				
	0,000254				
ELx+500`Z.	0,000380	0,000389	0,000285	3	n. s.
	0,000109				
	0,000679				
ELx	0,001196	0,000652	0,000769	2	
	0,000109				

Medial periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0,000489				
	0,000380				
ELx+50`Z.	0,000924	0,000598	0,000288	3	n. s.
	0,000598				
	0,000299				
ELx+500`Z.	0,000625	0,000507	0,000181	3	n. s.
	0,000598				
ELx	0,000652	0,000625	0,000038	2	

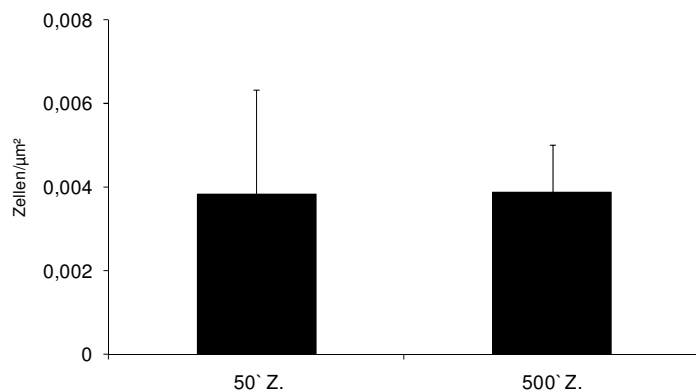
Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0				
	0,000716				
ELx+50`Z.	0,000667	0,000461	0,000400	3	n. s.
	0				
	0				
ELx+500`Z.	0,000462	0,000154	0,000267	3	n. s.
	0,000353				
ELx	0	0,000177	0,000250	2	

Tab. 13-15: Bezüglich der räumlichen Verteilung der markierten Zellen zeigte sich keine signifikante Auffälligkeit. Bei vier Tieren (R 9, R 12, R 13, R16) wurden im posterioren Bereich keine Zellen gefunden.

4.1.2.2 Zentrale Zone

ED1-positive Zellen nach Transplantation unterschiedlicher Zellanzahl in intakte Inselrinde in der zentralen Zone:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
50` Z.	0,001739	0,003819	0,002514	3	n. s.
	0,003106				
	0,006612				
500` Z.	0,004165	0,003863	0,001133	3	
	0,004814				
	0,002609				

Abb. 18 und Tab. 16: Bei der Transplantation in intakte Inselrinde zeigte sich zwischen den zwei verschiedenen Zellmengen im unmittelbaren Transplantationsareal kein relevanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl an aktivierten Makrophagen (anterior, medial und posterior zusammengefasst).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
50` Z.	0,001087	0,001232	0,001310	3	n. s.
	0				
	0,002609				
500` Z.	0,000842	0,000281	0,000486	3	
	0				
	0				

Medial zentrale Zone

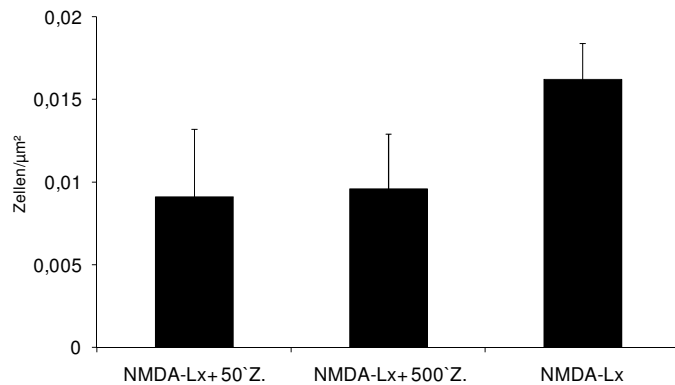
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
50` Z.	0,000652	0,002587	0,001735	3	n. s.
	0,003106				
	0,004004				
500` Z.	0,003323	0,002712	0,002464	3	
	0,004814				
	0				

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
50` Z.	0	0	0	3	n. s.
	0				
	0				
500` Z.	0	0,000870	0,001506	3	
	0				
	0,002609				

Tab. 17-19: Im posterioren Bereich wurden lediglich bei einem Tier (R 22) markierte Zellen gefunden. Auch anterior waren in wenigen Tieren (R 18, R 21, R 22) Zellen gefärbt. Die meisten Zellen traten im medialen Abschnitt auf. Es wurde zwischen den beiden transplantierten Zellmengen kein signifikanter Unterschied gefunden.

ED1-positive Zellen nach NMDA-Läsion und Transplantation unterschiedlicher Zellanzahl in der zentralen Zone:



Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50'Z.	0,011141	0,009109	0,004122	3	n. s.
	0,011821				
	0,004366				
NMDA-Lx+ 500'Z.	0,006168	0,009600	0,003307	3	n. s.
	0,009864				
	0,012766				
NMDA-Lx	0,014632	0,016188	0,002201	2	
	0,017745				

Abb. 19 und Tab. 20: Zwischen der Gruppe NMDA + 50.000 Zellen und der Kontrollgruppe sowie zwischen der Gruppe NMDA + 500.000 Zellen und der Kontrollgruppe wurden tendenziell signifikante Unterschiede mit jeweils $p = 0,083$ festgestellt (anterior, medial und posterior zusammengefasst). Hier wiesen die transplantierten Gruppen weniger markierte Zellen auf als die Kontrollgruppe. Diese Feststellung stimmte mit der Beobachtung in der peripheren Zone (NMDA-Lx mit $p = 0,083$ mehr ED1-positive Zellen als NMDA + 500.000 Zellen) überein.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50'Z.	0,009266	0,005996	0,004069	3	n. s.
	0,007283				
	0,001440				
NMDA-Lx+ 500'Z.	0,003750	0,004937	0,001060	3	n. s.
	0,005788				
	0,005272				
NMDA-Lx	0,005190	0,006046	0,001211	2	
	0,006902				

Medial zentrale Zone

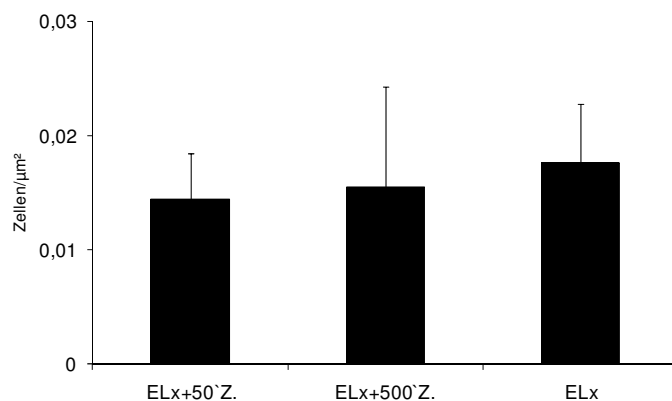
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50'Z.	0,001875	0,003004	0,001377	3	n. s.
	0,004538				
	0,002600				
NMDA-Lx+ 500'Z.	0,001196	0,002870	0,002315	3	n. s.
	0,001902				
	0,005511				
NMDA-Lx	0,007636	0,007364	0,000384	2	
	0,007092				

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50'Z.	0	0,000109	0,000188	3	0,046
	0				
	0,000326				
NMDA-Lx+ 500'Z.	0,001223	0,001793	0,000503	3	n. s.
	0,002174				
	0,001984				
NMDA-Lx	0,001806	0,002778	0,001375	2	
	0,003750				

Tab. 21-23: Während sich bei den markierten Zellen im anterioren Bereich kein relevanter Unterschied zeigte, konnten im medialen Abschnitt sowohl in der Gruppe NMDA + 50.000 Zellen als auch in der Gruppe NMDA + 500.000 Zellen tendenziell weniger markierte Makrophagen gefunden werden als in der Kontrollgruppe ($p = 0,083$). Im posterioren Areal errechnete sich zwischen den transplantierten Gruppen eine Signifikanz von $p = 0,046$, wobei die Gruppe mit 50.000 Zellen auch deutlich weniger markierte ED1-positive Zellen vorwies. Ähnliches zeigte sich zwischen der Gruppe NMDA + 50.000 Zellen und der Kontrollgruppe ($p = 0,076$).

ED1-positive Zellen nach Elektroläsion und Transplantation unterschiedlicher Zellanzahl in der zentralen Zone:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0,012962				
	0,011246				
ELx+50`Z.	0,018976	0,014395	0,004059	3	n. s.
	0,014429				
	0,007121				
ELx+500`Z.	0,024764	0,015438	0,008865	3	n. s.
	0,021250				
ELx	0,014022	0,017636	0,005111	2	

Abb. 20 und Tab. 24: Zwischen den elektroläsionierten, transplantierten Tieren und der Kontrollgruppe war kein signifikanter und auch kein tendenzieller Unterschied hinsichtlich der Anzahl an ED1-markierten Zellen in der unmittelbaren Läsionsregion zu erkennen (anterior, medial und posterior zusammengefasst).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0,006087				
	0,002011				
ELx+50`Z.	0,007170	0,005089	0,002720	3	n. s.
	0,006277				
	0,003007				
ELx+500`Z.	0,007609	0,005631	0,002368	3	n. s.
	0,006821				
ELx	0,000978	0,003899	0,004131	2	

Medial zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0,006875				
	0,003507				
ELx+50`Z.	0,007811	0,006065	0,002264	3	n. s.
	0,008152				
	0,004114				
ELx+500`Z.	0,011504	0,007923	0,003700	3	n. s.
	0,009130				
ELx	0,008587	0,008859	0,000384	2	

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0				
	0,005728				
ELx+50`Z.	0,003995	0,003241	0,002938	3	n. s.
	0				
	0				
ELx+500`Z.	0,005652	0,001884	0,003263	3	n. s.
	0,005299				
ELx	0,004457	0,004878	0,000596	2	

Tab. 25-27: Im anterioren und posterioren Abschnitt wurde kein relevanter Unterschied in der Anzahl an ED1-markierten Zellen zwischen den Gruppe gefunden. Im medialen Bereich lag die Makrophagenanzahl in der Gruppe ELx + 50.000 Zellen mit $p = 0,083$ tendenziell unter der Anzahl in der Kontrollgruppe.

Die Tiere R23 und R24, welche weder läsioniert noch transplantiert waren, zeigten keine markierten Zellen in der peripheren oder zentralen Zone auf. Eine Markierung von ED1-tragenden Zellen in nativen, weder läsionierten noch transplantierten Tieren wurde somit ausgeschlossen.

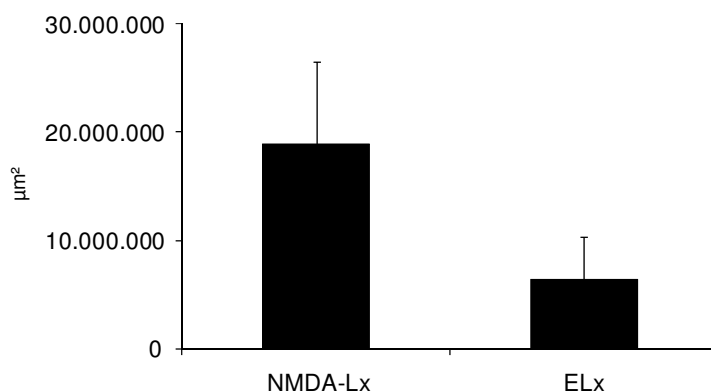
4.2 Läsionsart

Ein weiteres Experiment beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit sich Gehirnparenchym, das auf unterschiedliche Art und Weise beschädigt worden ist, hinsichtlich extrazellulärem Milieu und zellulärer Infrastruktur unterschied und das Überleben und das Wachstum der transplantierten Stammzellen beeinflusste. Es wurden für diese Fragestellung Tiergruppen bilateral mittels Injektion von NMDA bzw. elektrisch im Bereich der Inselrinde läsioniert und mit 50.000 / 5 μ l bzw. 500.000 / 5 μ l adulte SVZ-Stammzellen bilateral transplantiert.

4.2.1 Wachstums- und Integrationsanalyse anhand der CV-Färbung

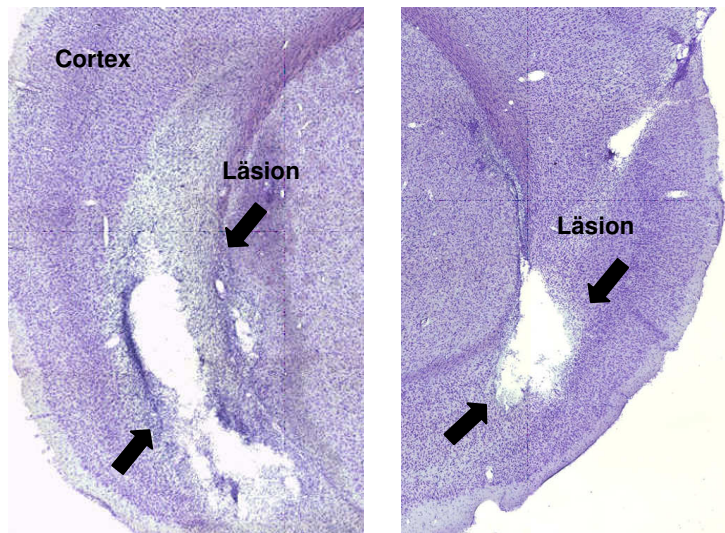
In der CV-Färbung wurde Morphologie, Größe der Läsionen bzw. Transplantate in intakter Inselrinde bzw. nach beiden Läsionsarten betrachtet.

Läsionsfläche bei verschiedenen Läsionsarten:



Gruppe	Läsion (μm^2)	Mittelwert (μm^2)	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	24.311.082	18.910.335	7.637.809	2	
	13.509.589				
ELx	3.641.615	6.431.460	3.945.438	2	
	9.221.307				

Abb. 21 und Tab. 28: Bereits bei der Betrachtung der Kontrolltiergruppen zeigte sich eine deutliche Flächendifferenz zwischen der NMDA-Läsion und der Elektroläsion mit $p = 0,121$ um fast das Dreifache.

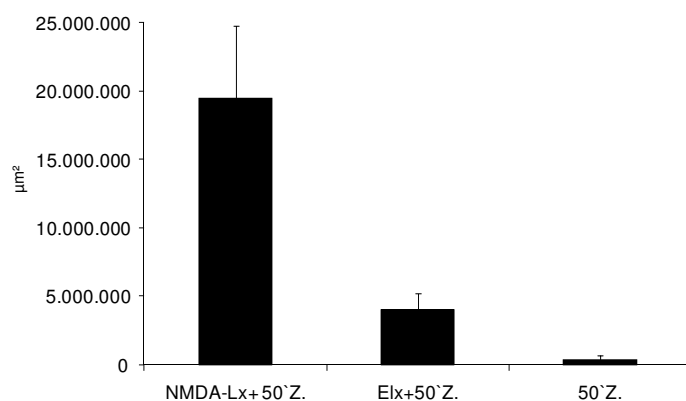


a) NMDA-Läsion

b) Elektroläsion

Abb. 22,23: Morphologisch zeigte sich eine wesentlich größere Läsionsfläche in der NMDA-Gruppe a) im Vergleich zur Elektroläsion b).

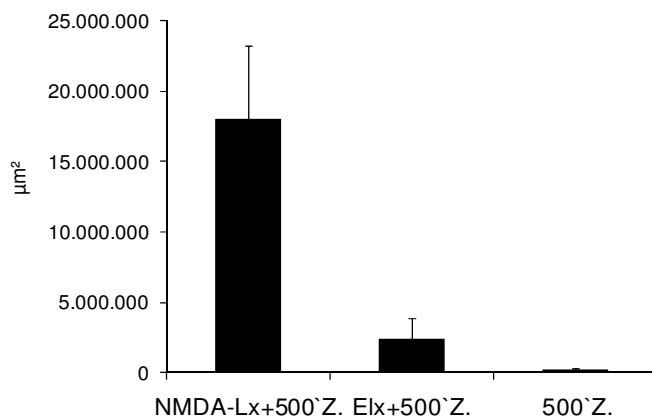
Transplantatfläche mit 50.000 Zellen bei verschiedenen Läsionsarten bzw. Transplantation in intakte Inselrinde:



Gruppe	festes Trans. (μm^2)	lockeres Trans. (μm^2)	fehlendes Trans. (μm^2)	gesamtes Trans. (μm^2)	n	Signifikanz
NMDA-Lx+50`Z.	0	13.531.350	12.445.133	25.976.483	3	0,050
	0	23.578.608	2.869.454	26.448.062		
	0	21.340.718	9.766.871	31.107.589		
ELx+50`Z.	30.412	2.750.566	3.471.886	6.252.864	3	0,050
	0	5.170.834	4.878.138	10.048.972		
	87.500	3.983.141	3.591.554	7.662.194		
50`Z.	23.021	101.713	67.784	192.518	3	
	194.241	0	0	194.241		
	0	731.966	32.450	764.415		

Abb. 24 und Tab. 29: Es wurden die verschiedenen Läsionsarten mit jeweils 50.000 transplantierten Zellen verglichen (Abb. mit festem und lockerem Transplantat). Hier zeigte sich, dass die NMDA-Gruppe mit $p = 0,050$ (Tabelle; lockeres, festes + lockeres, gesamtes Transplantat) und mit $p = 0,121$ (festes Transplantat) mehr an Transplantatfläche gegenüber der Gruppe ELx + 50.000 Zellen aufwies. Gegenüber der Kontrollgruppe waren die Werte ähnlich. So wurde $p = 0,121$ (festes Transplantat) und in den übrigen Kategorien (lockeres, festes + lockeres, fehlendes, gesamtes Transplantat) $p = 0,050$ errechnet. Auch die ELx-Gruppe lag beim lockeren, fehlenden, festen + lockeren und gesamten Transplantat über der Kontrollgruppe ($p = 0,050$). Insgesamt war in der NMDA-Gruppe und ELx-Gruppe überwiegend lockeres Transplantat zu erkennen.

Transplantatfläche mit 500.000 Zellen bei verschiedenen Läsionsarten bzw. Transplantation in intakte Inselrinde:



Gruppe	festes Trans. (μm^2)	lockeres Trans. (μm^2)	fehlendes Trans. (μm^2)	gesamtes Trans. (μm^2)	n	Signifikanz
NMDA-Lx+500`Z.	0	20.576.400	2.578.142	23.154.542	3	0,037
	74.426	21.418.315	6.627.905	28.120.646		
	0	11.931.566	796.148	12.727.713		
ELx+500`Z.	0	2.021.202	8.243.807	10.265.008	3	0,037
	0	4.015.727	545.431	4.561.158		
	0	1.124.356	1.378.143	2.502.499		
500`Z.	203.416	0	0	203.416	3	
	32.202	0	0	32.202		
	336.822	0	0	336.822		

Abb. 25 und Tab. 30: Vergleich man in den Gruppen mit jeweils 500.000 transplantierten Zellen den Anteil der einzelnen Morphologien an der Gesamtfläche, wurde deutlich, dass bei der NMDA-läsionierten Gruppe lockeres Transplantat überwog. Dagegen lag bei der Elektroläsion prozentual mehr fehlendes Gewebe vor. Das morphologisch als „fest“ bezeichnete Transplantat war überwiegend in der nicht-läsionierten Kontrollgruppe vertreten. Die NMDA-Gruppe hatte, festes und lockeres Transplantat zusammengefasst, eine etwa um 7fach größere Transplantatfläche als die elektroläsionierte Gruppe bzw. ein 94mal größeres Transplantat als die Kontrollgruppe. Die Gruppe ELx + 500.000 Zellen hatte eine 12fach größere Transplantatfläche als die Kontrollgruppe.

In der Gruppe NMDA + 500.000 Zellen wurde gegenüber der Gruppe ELx + 500.000 Zellen ein größeres Transplantat (locker, locker + fest, gesamt, $p = 0,050$) gefunden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wies die Gruppe NMDA + 500.000 Zellen mit $p = 0,037$ eine signifikante Differenz beim lockeren und fehlenden Transplantat, mit $p = 0,050$ einen tendenziellen Unterschied beim festen + lockeren und gesamten Transplantat und mit $p = 0,121$ mehr festes Transplantat auf.

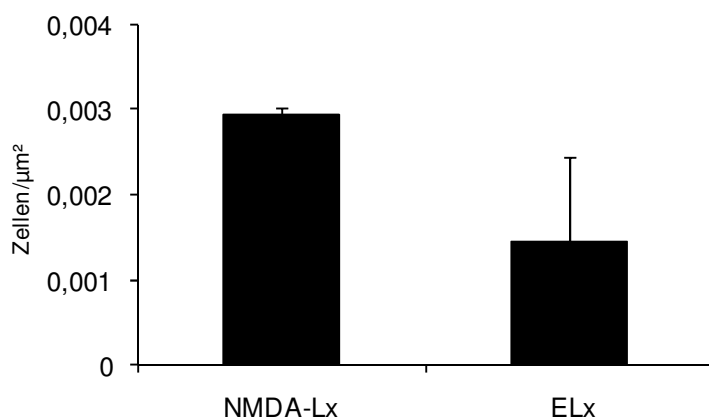
Die Gruppe ELx + 500.000 Zellen hatte mit $p = 0,037$ gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikant (festes, lockeres, fehlendes Transplantat) und mit $p = 0,050$ (festes + lockeres, gesamtes Transplantat) tendenziell größere Transplantate.

4.2.2 Makrophagen-Aktivität anhand Zählung ED1-positiver Zellen

Schließlich analysierte man anhand der Zählung von ED1-markierten Zellen im läsionsperipheren sowie läsionsangrenzenden Cortex, inwieweit die beiden angewandten Läsionsverfahren, nämlich elektrische Läsion und Läsion durch NMDA, Mikroglia aktivierten und eine Abräumreaktion auslösten.

4.2.2.1 Periphere Zone

ED1-positive Zellen in der peripheren Zone bei der NMDA-Läsion und Elektroläsion:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,002889	0,002939	0,000071	2	n. s.
	0,002989				
ELx	0,002147	0,001454	0,000980	2	
	0,000761				

Abb. 26 und Tab. 31: In der peripheren Zone zeigte die NMDA-Läsion mehr ED1-positive Zellen auf als die ELx-Gruppe ($p = 0,121$) (anterior, medial und posterior zusammengefasst).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,001884	0,001472	0,000583	2	n. s.
	0,001060				
ELx	0,001196	0,000652	0,000769	2	
	0,000109				

Medial periphere Zone

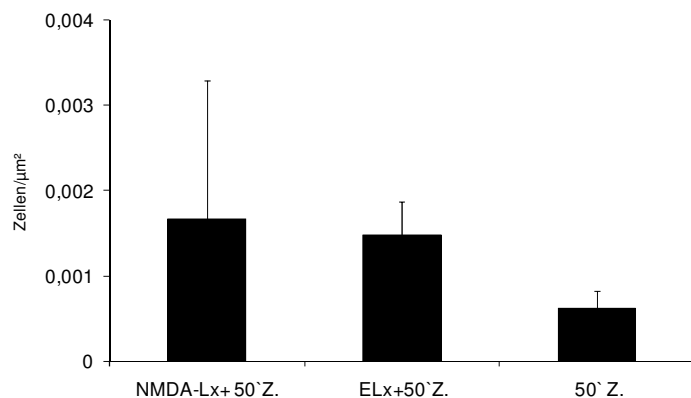
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,000734	0,000910	0,000250	2	n. s.
	0,001087				
ELx	0,000598	0,000625	0,000038	2	
	0,000652				

Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,000272	0,000557	0,000404	2	n. s.
	0,000842				
ELx	0,000353	0,000177	0,000250	2	
	0				

Tab. 32-34: In allen drei separaten Bereichen zeigte die NMDA-Gruppe mehr markierte Zellen auf ($p = 0,121$).

ED1-positive Zellen in der peripheren Zone nach Transplantation von 50.000 Zellen bei verschiedenen Läsionsarten:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,003460	0,001661	0,001633	3	n. s.
	0,001250				
	0,000272				
ELx+50`Z.	0,001060	0,001478	0,000395	3	0,050
	0,001531				
	0,001845				
50`Z.	0,000435	0,000616	0,000208	3	
	0,000842				
	0,000571				

Abb. 27 und Tab. 35: Zwischen den läsionierten Gruppen wurde kein relevanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl an markierten Abwehrzellen (anterior + medial + posterior) gefunden. Die elektroläsionierten Tiere hatten tendenziell signifikant mehr ED1-positive Zellen als die Kontrolltiere ($p = 0,050$). Innerhalb der NMDA-Gruppe zeigten die Tiere deutlich unterschiedliche Werte auf.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,002011	0,000978	0,000943	3	n. s.
	0,000761				
	0,000163				
ELx+50`Z.	0,000571	0,000420	0,000159	3	n. s.
	0,000435				
	0,000254				
50`Z.	0,000408	0,000217	0,000205	3	
	0				
	0,000245				

Medial periphere Zone

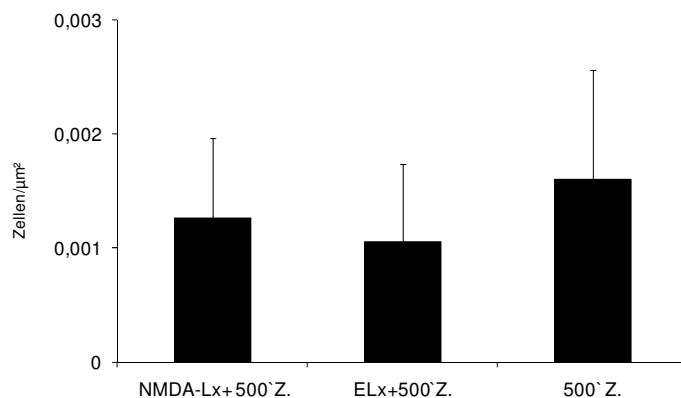
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,001449	0,000673	0,000702	3	n. s.
	0,000489				
	0,000082				
ELx+50`Z.	0,000489	0,000598	0,000288	3	n. s.
	0,000380				
	0,000924				
50`Z.	0,000272	0,000272	0,000222	3	
	0,000462				
	0,000326				

Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0	0,000009	0,000016	3	n. s.
	0				
	0,0000272				
ELx+50`Z.	0	0,000461	0,000400	3	n. s.
	0,000716				
	0,000667				
50`Z.	0	0,000127	0,000220	3	
	0,000380				
	0				

Tab. 36-38: In den einzelnen räumlichen Abschnitten wurden vor allem im posterioren Bereich einiger Tiere keine markierten Zellen gefunden. Die elektroläsionierte Gruppe wies im anterioren und medialen Areal im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr ED1-positive Zellen auf ($p = 0,127$), wie sich in der vorangegangenen Gesamtübersicht angedeutet hatte.

ED1-positive Zellen in der peripheren Zone nach Transplantation von 500.000 Zellen bei verschiedenen Läsionsarten:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,000598	0,001265	0,000699	3	n. s.
	0,001205				
	0,001993				
ELx+500`Z.	0,000978	0,001051	0,000682	3	n. s.
	0,000408				
	0,001766				
500`Z.	0,000625	0,001603	0,000960	3	
	0,001639				
	0,002543				

Abb. 28 und Tab. 39: Zwischen den verschiedenen Läsionsarten nach Transplantation von 500.000 Zellen waren in der Kontrollgruppe um etwa 1,3mal bzw. 1,5mal mehr ED1-positive Zellen (anterior + medial + posterior zusammengefasst) vorhanden als in der NMDA-Gruppe bzw. in der ELx-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,000245	0,000513	0,000361	3	0,046
	0,000924				
	0,000371				
ELx+500`Z.	0,000380	0,000389	0,000285	3	n. s.
	0,000109				
	0,000679				
500`Z.	0,000163	0,000054	0,000094	3	
	0				
	0				

Medial periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,000217	0,000314	0,000241	3	n. s.
	0,000136				
	0,000589				
ELx+500`Z.	0,000598	0,000507	0,000181	3	n. s.
	0,000299				
	0,000625				
500`Z.	0,000462	0,001371	0,000809	3	
	0,001639				
	0,002011				

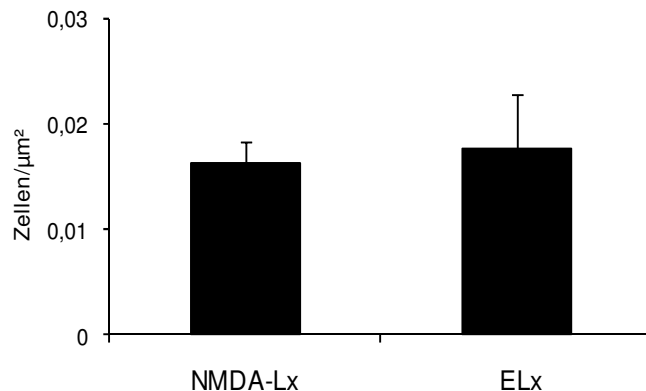
Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,000136	0,000438	0,000515	3	n. s.
	0,000145				
	0,001033				
ELx+500`Z.	0	0,000154	0,000267	3	n. s.
	0				
	0,000462				
500`Z.	0	0,000178	0,000308	3	
	0				
	0,000533				

Tab. 40-42: Betrachtete man die einzelnen räumlichen Abschnitte separat, wies die NMDA-Gruppe im anterioren Bereich 9,5mal mehr markierte Zellen auf als die Kontrollgruppe ($p = 0,046$), gefolgt von der ELx-Gruppe ($p = 0,121$). Währenddessen hatte im medialen Areal die Kontrollgruppe um 2,7mal mehr ED1-positive Zellen im Vergleich zur ELx-Gruppe und 4,3mal mehr Zellen im Vergleich zur NMDA-Gruppe ($p = 0,127$); die ELx-Gruppe zeigte mit $p = 0,127$ mehr markierte Zellen auf als die NMDA-Gruppe.

4.2.2.2 Zentrale Zone

ED1-positive Zellen in der zentralen Zone bei der NMDA-Läsion und Elektroläsion:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,014632	0,016188	0,002201	2	n. s.
	0,017745				
	0,021250				
ELx	0,014022	0,017636	0,005111	2	

Abb. 29 und Tab. 43: Im Vergleich der beiden Läsionsarten wurde kein relevanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl an ED1-positiven Zellen (anterior, medial und posterior zusammengefasst) in der unmittelbaren Umgebung der Läsion festgestellt.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,005190	0,006046	0,001211	2	n. s.
	0,006902				
ELx	0,006821	0,003899	0,004131	2	
	0,000978				

Medial zentrale Zone

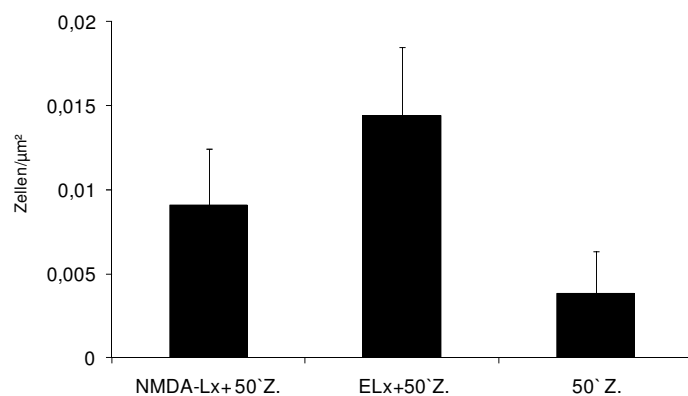
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,007636	0,007364	0,000384	2	n.s
	0,007092				
ELx	0,009130	0,008859	0,000384	2	
	0,008587				

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx	0,001806	0,002778	0,001375	2	n. s.
	0,003750				
ELx	0,005299	0,004878	0,000596	2	
	0,004457				

Tab. 44-46: In der räumlichen Aufteilung (anterior, medial und posterior separat) waren in der Gruppe der NMDA-Läsion im medialen und posterioren Abschnitt weniger markierte Zellen vorhanden als in der ELx-Gruppe ($p = 0,121$).

ED1-positive Zellen in der zentralen Zone nach Transplantation von 50.000 Zellen bei verschiedenen Läsionsarten:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,011141	0,009109	0,004122	3	n. s.
	0,011821				
	0,004366				
ELx+50`Z.	0,012962	0,014395	0,004059	3	0,050
	0,011246				
	0,018976				
50`Z.	0,001739	0,003819	0,002514	3	
	0,003106				
	0,006612				

Abb. 30 und Tab. 47: Bei der Transplantation von 50.000 Zellen waren in der ELx-Gruppe (anterior, medial und posterior zusammengefasst) am meisten markierte Zellen vorhanden. Gegenüber der Kontrollgruppe war ein tendenziell signifikanter Unterschied ($p = 0,050$) zu erkennen. Die NMDA-Gruppe hatte gegenüber der Kontrollgruppe mehr markierte Zellen vorzuweisen ($p = 0,127$).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,009266	0,005996	0,004069	3	n. s.
	0,007283				
	0,001440				
ELx+50`Z.	0,006087	0,005089	0,002720	3	n. s.
	0,002011				
	0,007170				
50`Z.	0,001087	0,001232	0,001310	3	
	0				
	0,002609				

Medial zentrale Zone

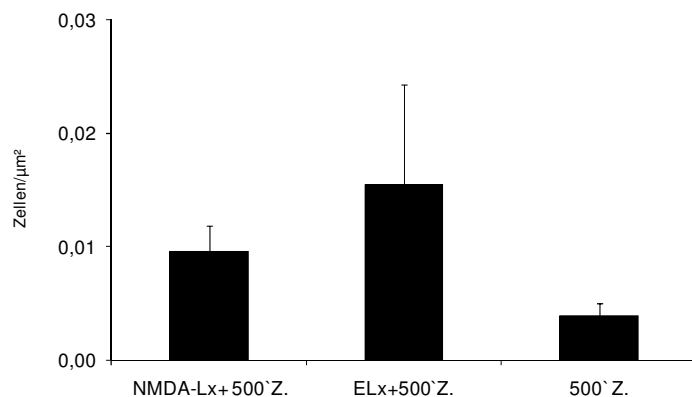
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,001875	0,003004	0,001377		n. s.
	0,004538				
	0,002600				
ELx+50`Z.	0,006875	0,006065	0,002264		n. s.
	0,003507				
	0,007811				
50`Z.	0,000652	0,002587	0,001735		
	0,003106				
	0,004004				

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0				
	0				
NMDA-Lx+ 50`Z.	0,000326	0,000109	0,000188	3	n. s.
	0				
	0,005728				
ELx+50`Z.	0,003995	0,003241	0,002938	3	n. s.
	0				
	0				
50` Z.	0	0	0	3	

Tab. 48-50: Im anterioren Bereich waren in den läsierten Gruppen mehr markierte Makrophagen vorhanden als in der Kontrollgruppe ($p = 0,127$). Im medialen und posterioren Abschnitt hatte die elektroläsierte Gruppe mehr Zellen als in der Kontrollgruppe ($p = 0,127$).

ED1-positive Zellen in der zentralen Zone nach Transplantation von 500.000 Zellen bei verschiedenen Läsionsarten:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0,006168				
	0,009864				
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,012766	0,009600	0,003307	3	0,050
	0,014429				
	0,007121				
ELx+500`Z.	0,024764	0,015438	0,008865	3	0,050
	0,004165				
	0,004814				
500` Z.	0,002609	0,003863	0,001133	3	

Abb. 31 und Tab. 51: ED1-positive Zellen der einzelnen Versuchsgruppen zentral um die Transplantationsregion (anteriore, mediale und posteriore Abschnitte zusammengefasst) waren vor allem in der ELx-Gruppe vorhanden (Abb.). Gegenüber den NMDA-Tieren waren hier im Mittel 1,6mal mehr markierte Zellen vorhanden und sogar viermal mehr als in der Kontrollgruppe ($p = 0,050$). Die NMDA-Gruppe hatte 2,5mal mehr aktivierte Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,050$).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,003750	0,004937	0,001060	3	0,046
	0,005788				
	0,005272				
ELx+500`Z.	0,006277	0,005631	0,002368	3	0,046
	0,003007				
	0,007609				
500`Z.	0,000842	0,000281	0,000486	3	
	0				
	0				

Medial zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,001196	0,002870	0,002315	3	n. s.
	0,001902				
	0,005511				
ELx+500`Z.	0,008152	0,007923	0,003700	3	n. s.
	0,004114				
	0,011504				
500`Z.	0,003323	0,002712	0,002464	3	
	0,004814				
	0				

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
NMDA-Lx+ 500`Z.	0,001223	0,001793	0,000503	3	n. s.
	0,002174				
	0,001984				
ELx+500`Z.	0	0,001884	0,003263	3	n. s.
	0				
	0,005652				
500`Z.	0	0,00087	0,001506	3	
	0				
	0,002609				

Tab. 52-54: Bei näherer Betrachtung der räumlichen Verteilung der ED1-positiven Zellen unmittelbar um die Transplantatzone, war bei den läsionierten Gruppen eine Verlagerung der Zellen in den anterioren Bereich zu erkennen ($p = 0,046$ gegenüber der Kontrollgruppe). Im Vergleich aller Gruppen waren in der ELx-Gruppe mehr ED1-positive Zellen im medialen Bereich vorhanden ($p = 0,127$).

Tier R 23 und R 24, welche weder läsioniert noch transplantiert waren, zeigten keine markierten Zellen auf.

4.3 Immunmodulation

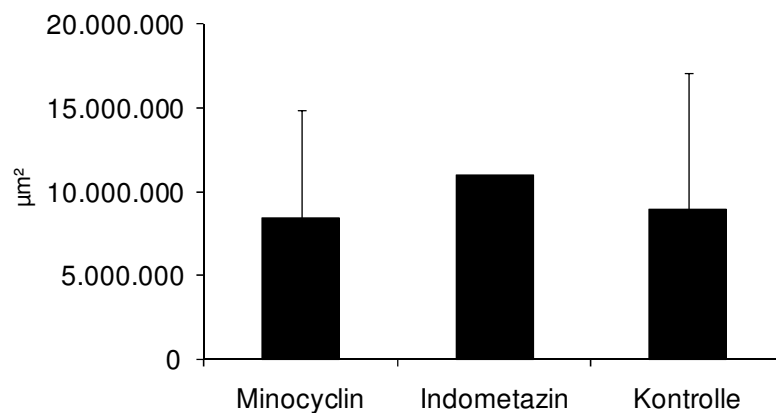
Im nun geschilderten Versuch sollte durch medikamentöse Behandlung (Minocyclin und Indomethazin) die durch Elektroläsion künstlich gesetzte Entzündungsreaktion im Gewebe unterdrückt werden. Es wurde untersucht, ob die Stammzellen dadurch besser überleben und sich stärker integrieren konnten.

4.3.1 Wachstum- und Integrationsanalyse anhand der CV-Färbung

In der CV-Färbung betrachtete man die Lage, Größe und Morphologie der Läsionen bzw. Transplantate.

Elektroläsion und Immunmodulatoren:

Zunächst analysierte man das Gewebe nach Elektroläsion unter Einfluss von Immunmodulatoren.



Gruppe	Fläche (µm²)	Mittelwert (µm²)	STD	n	Signifikanz
	3.871.670				
ELx+Minocyclin	12.969.303	8.420.486	6.432.998	2	n. s.
ELx+Indomethazin	10.941.524	10.941.524	0	1	n. s.
	14.718.444				
ELx+Kontroll-Puffer	3.201.008	8.959.726	8.144.057	2	

Abb. 32 und Tab. 55: Die Tabelle zeigt, dass zwischen den immunmodulierten und nativen Läsionsgrößen keine relevante Differenz festgestellt werden konnte, wobei die einzelnen Werte auch innerhalb der einzelnen Gruppen stark voneinander abwichen. In der Gruppe mit Indomethazin starb ein Versuchstier am sechsten postoperativen Tag, sodass hier $n = 1$ vorlag und die Aussagekraft dieser Gruppe und die Vergleichbarkeit mit den anderen Tiergruppen stark eingeschränkt war. Es konnte keine Signifikanz zur Kontrollgruppe oder zwischen beiden Immungruppen nachgewiesen werden.

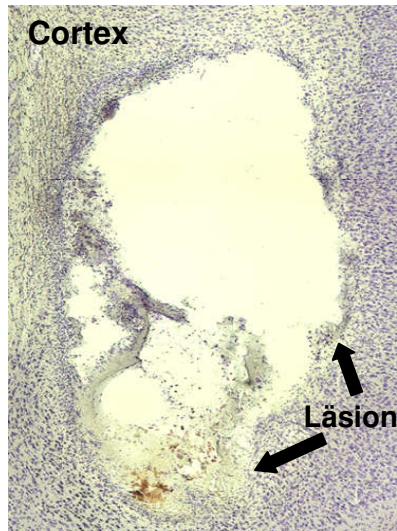
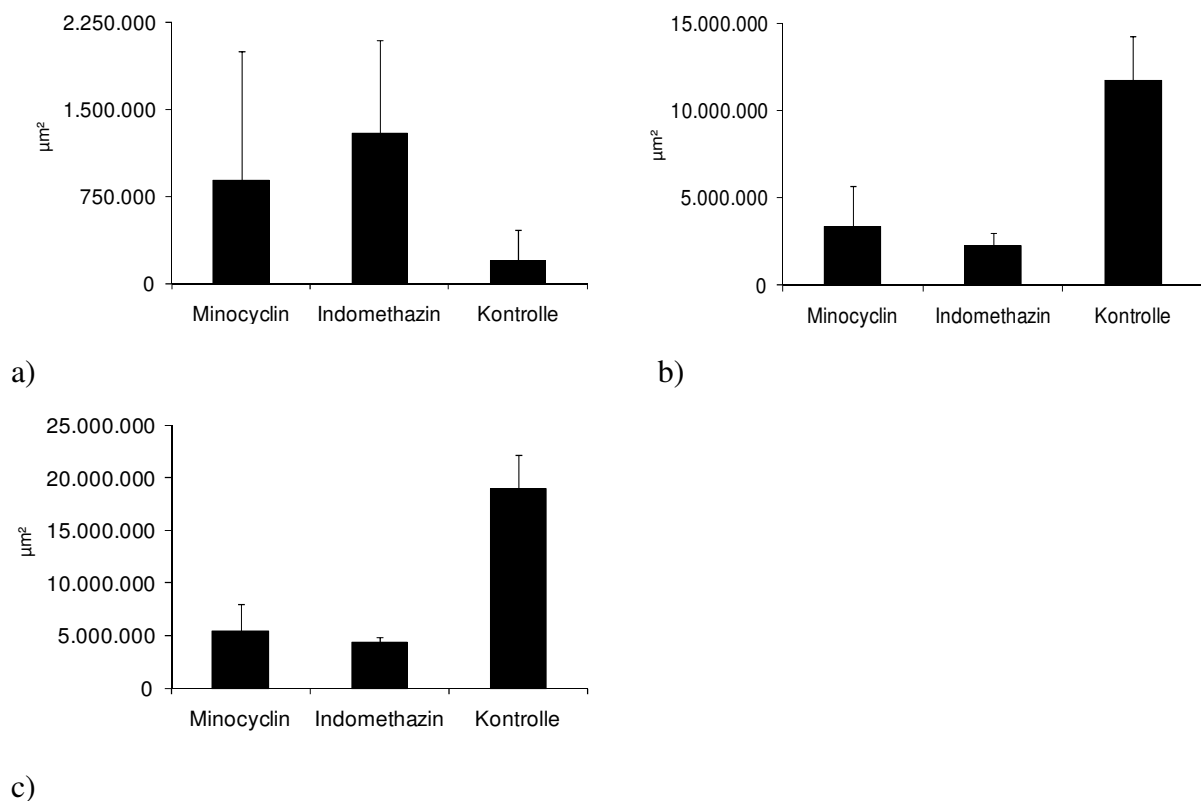


Abb. 33: CV-gefärbter Gewebsschnitt eines elektroläsionierten Tieres aus der Kontroll-Gruppe.

Die morphologische Betrachtung veranschaulicht die traumatische Auswirkung der Elektroläsion auf das Gewebe. Dabei erkennt man das zerstörte Parenchym, das durch die elektrische Hitzeentwicklung verbrannt oder dermaßen in Mitleidenschaft gezogen wurde, dass es durch die weitere histologische Verarbeitung sehr leicht beschädigt werden konnte. An seine Stelle entstand eine annähernd glattrandige zirkuläre Läsion.

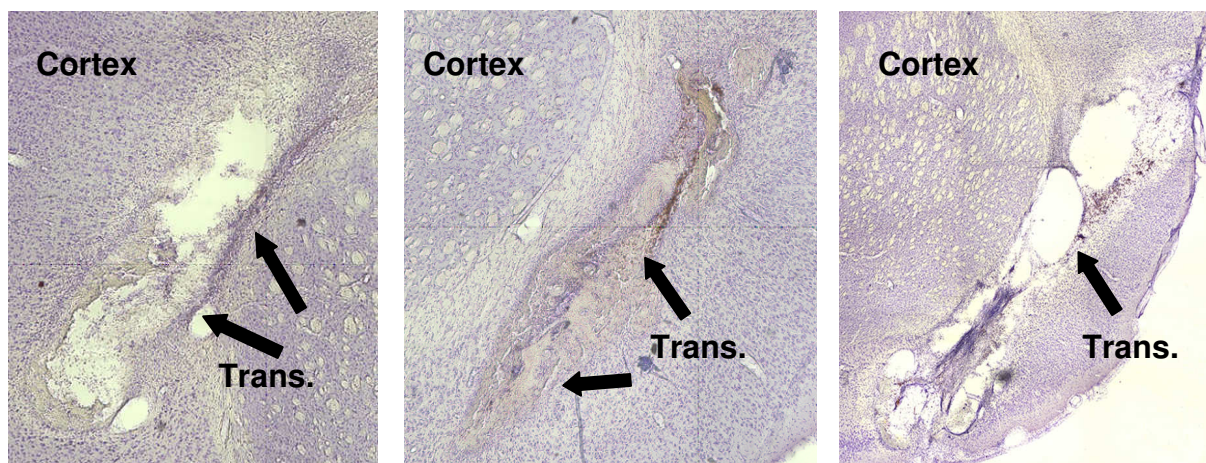
Elektroläsion und Transplantation unter Immunmodulation:

In einer weiteren Versuchsanordnung wurde in elektroläsioniertem Gewebe Größe und morphologisches Aussehen der Transplantate unter Einfluss von Immunmodulatoren analysiert.



Gruppe	festes Trans. (μm^2)	lockeres Trans. (μm^2)	fehlendes Trans. (μm^2)	gesamtes Trans. (μm^2)	n	Signifi- kanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	1.677.435 92.747	1.648.814 4.984.143	320.727 2.155.820	3.646.976 7.232.710	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	1.862.417 715.243	2.747.753 1.724.872	92.416 1.535.817	4.702.587 3.975.932	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0 381.883	13.486.231 9.875.741	3.297.159 11.015.202	16.783.389 21.272.826	2	

Abb. 34-36 und Tab. 56: a) Festes und b) lockeres Transplantat nach Elektroläsion unter Immunmodulation. Festes Transplantat wurde vor allem in den immunmodulierten Tieren gefunden. Dagegen zeigte die Kontrollgruppe die größte Fläche mit lockerem Transplantatgewebe auf. Zwischen den immunmodulierten Gruppen gab es keine Signifikanz in den morphologischen Untergruppen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sie jedoch kleinere Transplantatflächen (locker, fehlend und gesamt) auf ($p = 0,121$).
c) Die größte Transplantatfläche (fest + locker + fehlend) besaß die Kontrollgruppe. Wie auch in der Tabelle dargestellt ist, wiesen die Kontrolltiere vermehrt auch fehlendes Gewebe auf ($p = 0,121$).

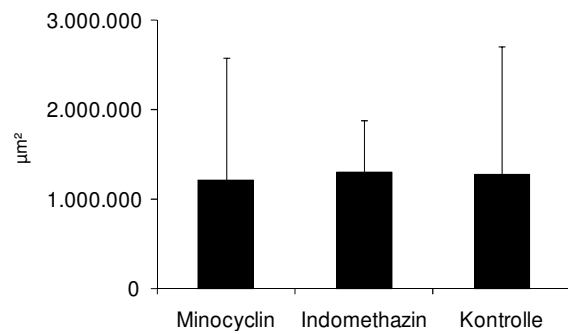


a) ELx + Minocyclin + Transplantat b) ELx + Indomethazin + Transplantat c) ELx + Puffer + Transplantat

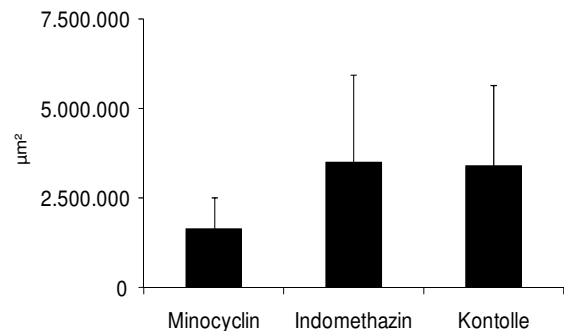
Abb. 37-39: Minocyclin a) und Indomethazin b) besaßen im Vergleich zur Kontrolle c) mehr kompaktes Transplantat. Auch wiesen sie im Vergleich deutlich weniger fehlendes Gewebe auf, was möglicherweise auf eine höhere Stabilität und ein kompakteres Wachstum der Stammzellen zurückzuführen war.

Transplantation in intakte Inselrinde unter Immunmodulation:

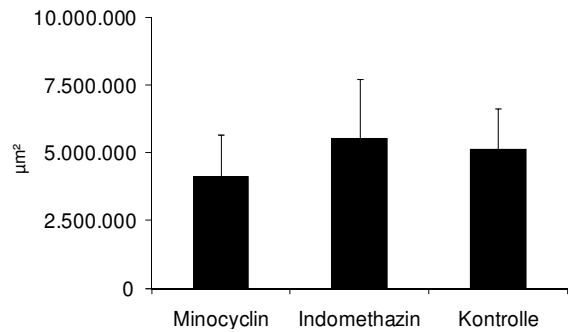
Zum Vergleich wurde untersucht, ob immunmodulierende Medikamente das Wachstum und die Integration von adulten SVZ-Stammzellen, die in die intakte Inselrinde transplantiert wurden, beeinflussten.



a)



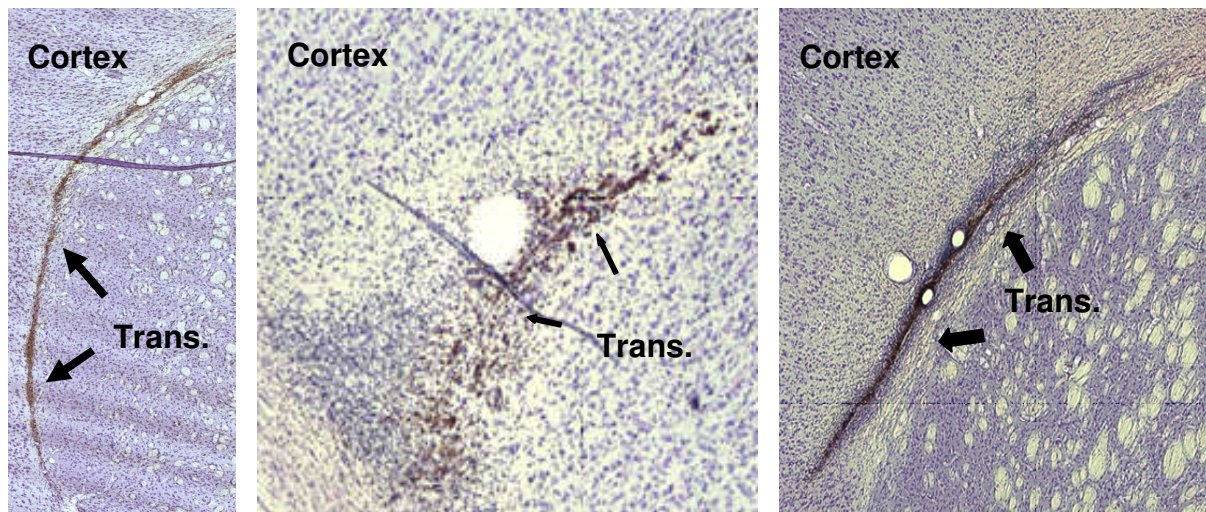
b)



c)

Gruppe	festes Trans. (µm²)	lockeres Trans. (µm²)	fehlendes Trans. (µm²)	gesamtes Trans. (µm²)	n	Signifikanz
Trans.+ Minocyclin	305.048	775.957	2.327.163	3.408.169	3	n. s.
	2.789.264	1.687.604	1.406.271	5.883.139		
	537.756	2.508.898	73.679	3.120.334		
Trans.+ Indomethazin	1.955.719	1.251.315	0	3.207.035	3	n. s.
	1.073.828	6.091.342	388.918	7.554.088		
	851.962	3.157.002	1.773.617	5.782.581		
Trans.+ Kontroll-Puffer	2.285.278	1.816.084	0	4.101.361	2	
	245.122	5.007.135	942.889	6.195.146		

Abb. 40-42 und Tab. 57: Aufteilung der Transplantatfläche bei immunmodulierend behandelten Tieren mit nicht-läsionierter Inselrinde sowie Kontrolltieren nach morphologischen Eigenschaften: a) fest, b) locker, c) gesamte Transplantatfläche mit fehlendem Gewebe. In der Gruppe mit Indomethazin sowie der Kontrollgruppe waren annähernd gleich viel lockeres und festes Transplantat vorhanden. Die Minocyclin-Gruppe hatte im Vergleich hierzu weniger, jedoch nicht signifikant, lockeres Gewebe.



a) Transplantat +
Minocyclin

b) Transplantat + Indomethazin

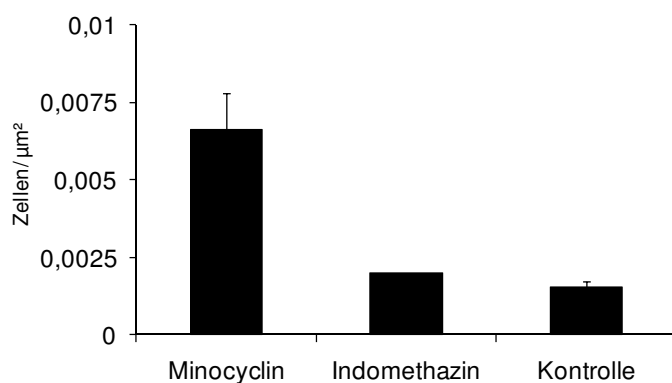
c) Transplantat + Kontroll-Puffer

Abb. 58-60: In intaktem Gewebe c) und unter Einfluss von Indomethazin b) zeigten sich größere Transplantate mit lockerer Morphologie als unter Einfluss von Minocyclin a).

4.3.2 Makrophagen-Aktivität anhand Zählung ED1-positiver Zellen

4.3.2.1 Periphere Zone

Immunmodulation: ED1-positive Zellen nach Elektroläsion in der peripheren Zone:



Gruppe	Zellen/μm²	Mittelwert Zellen/μm²	STD	n	Signifikanz
ELx+Minocyclin	0,007446 0,005788	0,006617	0,001172	2	n. s.
ELx+ Indomethazin	0,002011	0,002011	0	1	n. s.
ELx+Kontroll- Puffer	0,001449 0,001667	0,001558	0,000154	2	

Abb. 46 und Tab. 58: Bildliche Gegenüberstellung der ED1-positiven Zellen (anteriorer, medialer und posteriorer Wert zusammengefasst) nach ELx in immunmodulierten und nicht-immunmodulierten Gruppen. In der Gruppe ELx + Indomethazin betrug die Tieranzahl $n = 1$. Somit war die Aussagekraft der Werte stark eingeschränkt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe ELx + Minocyclin und Kontrollgruppe festgestellt werden ($p = 0,121$).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+ Minocyclin	0,005625 0,003587	0,004606	0,001441	2	n. s.
ELx+ Indomethazin	0	0	0	1	n. s.
ELx+Kontroll- Puffer	0 0	0	0	2	

Medial periphere Zone

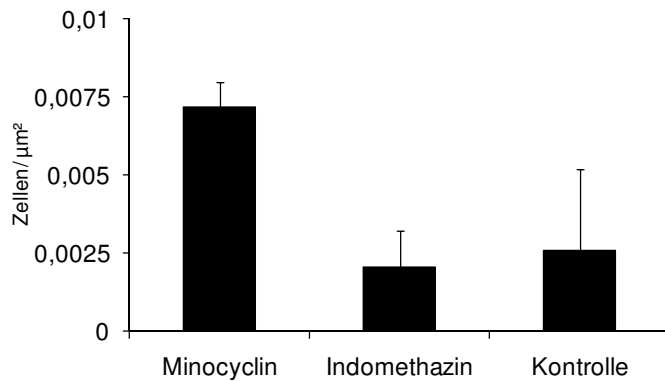
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+ Minocyclin	0,001821 0,002201	0,002011	0,000269	2	n. s.
ELx+ Indomethazin	0,002011	0,002011	0	1	n. s.
ELx+Kontroll- Puffer	0,001449 0,001667	0,001558	0,000154	2	

Posterior periphere Zone

Es wurden keine ED1-positiven Zellen gemessen.

Tab. 59-60: In den obigen Tabellen wurde die räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen dargestellt. Hier zeigte sich, dass sie in der Indomethazin-Gruppe und der Kontrollgruppe ausschließlich im medialen Bereich auftraten. In der Minocyclin-Gruppe waren die markierten Zellen im anterioren und medialen Gebiet zu erkennen ($p = 0,121$). Nach posterior zeigte sich keine Ausbreitung.

Immunmodulation: ED1-positive Zellen nach Elektroläsion und Transplantation in der peripheren Zone:



Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,006576 0,007745	0,007160	0,000826	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0,001250 0,002880	0,002065	0,001153	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0,000707 0,004429	0,002568	0,002632	2	

Abb. 47 und Tab. 61: ED1-positive Zellen im läsionsperipheren Cortex nach elektrischer Läsion und Transplantation bei Immunmodulation und Kontrollgruppe (anterior, medial und posterior zusammengefasst). Zwischen der Minocyclin-Gruppe und Kontrollgruppe bzw. Indomethazin-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,121$).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,001929 0,001984	0,001957	0,000038	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0,001250 0,002880	0,002065	0,001153	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0 0,002609	0,001304	0,001845	2	

Medial periphere Zone

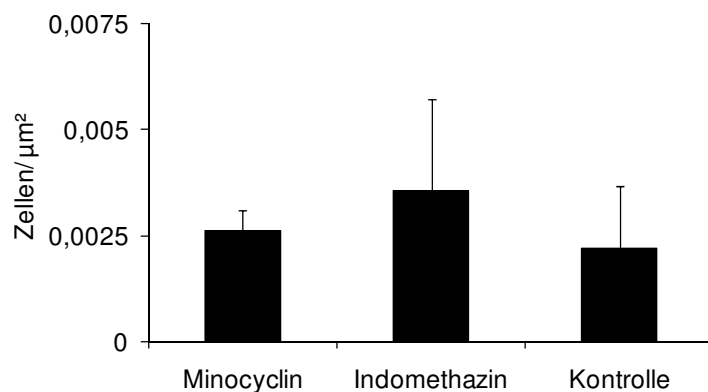
Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,001413 0,003288	0,002351	0,001326	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0 0	0	0	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0,000707 0,001821	0,001264	0,000788	2	

Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,003234 0,002473	0,002853	0,000538	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0 0	0	0	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0 0	0	0	2	

Tab. 62-64: In der räumlichen Verteilung waren in der Minocyclin-Gruppe erneut in allen drei Abschnitten markierte Zellen vorhanden. Dagegen fand man sie in der Indomethazin-Gruppe nur im anterioren Bereich, in der Kontrollgruppe im anterioren und medialen Bereich. Es zeigten sich Unterschiede zwischen Minocyclin und Indomethazin bzw. Kontrolle ($p = 0,102$).

Immunmodulation: ED1-positive Zellen nach Transplantation in intakte Inselrinde in der peripheren Zone:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
Trans.+ Minocyclin	0,002853 0,002935 0,002038	0,002609	0,000496	3	n. s.
Trans.+ Indomethazin	0,002038 0,006033 0,002582	0,003551	0,002166	3	n. s.
Trans.+ Kontroll- Puffer	0,001196 0,003234	0,002215	0,001441	2	

Abb. 48 und Tab. 65: Zwischen den transplantierten, immunmodulierten Tiergruppen mit intakter Inselrinde und der transplantierten Kontrollgruppe zeigte die Indomethazin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um 1,6mal bzw. zur Minocyclin-Gruppe um 1,4mal mehr ED1-positive Zellen auf. Zu einer signifikanten Differenz reichte es jedoch nicht (anterior, medial und posteriorer Abschnitt zusammengefasst).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0,001060				
Trans.+ Minocyclin	0	0,000353	0,000612	3	n. s.
	0				
Trans.+ Indomethazin	0,002582	0,001042	0,001361	3	n. s.
	0,000543				
Trans.+ Kontroll- Puffer	0	0	0	2	
	0				

Medial periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0,001793				
Trans.+ Minocyclin	0,001658	0,001830	0,000193	3	n. s.
	0,002038				
	0,001033				
Trans.+ Indomethazin	0,002772	0,001839	0,000876	3	n. s.
	0,001712				
Trans.+ Kontroll- Puffer	0,000788	0,001454	0,000942	2	
	0,002120				

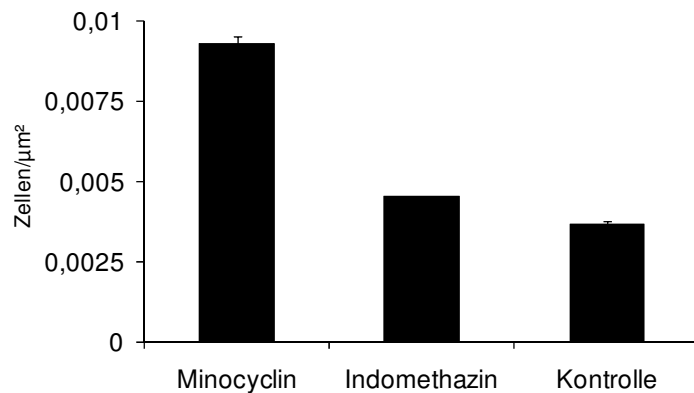
Posterior periphere Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0				
Trans.+ Minocyclin	0,001277	0,000426	0,000737	3	n. s.
	0				
	0,001005				
Trans.+ Indomethazin	0,000679	0,000670	0,000340	3	n. s.
	0,000326				
Trans.+ Kontroll- Puffer	0,000408	0,000761	0,000500	2	
	0,001114				

Tab. 66-68: In der räumlichen Verteilung fiel auf, dass sich anterior kaum markierte Zellen fanden. Sie tauchten hauptsächlich medial und posterior auf. Medial führten die Indomethazin-Gruppe und die Kontrollgruppe an. Posterior war die Minocyclin-Gruppe führend (2,1fach im Vergleich zur Indomethazin-Gruppe, 1,4fach im Vergleich zur Kontrollgruppe).

4.3.2.2 Zentrale Zone

Immunmodulation: ED1-positive Zellen nach Elektroläsion in der zentralen Zone:



Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+Minocyclin	0,009457	0,009298	0,000224	2	n. s.
	0,009139				
ELx+Indomethazin	0,004538	0,004538	0	1	n. s.
ELx+Kontroll-Puffer	0,003614	0,003673	0,000083	2	
	0,003732				

Abb. 49 und Tab. 69: ED1-positive Zellen im direkt läsionsumgebenden Gewebe nach elektrischer Läsion unter Immunmodulation und in der Kontrollgruppe. In der Minocyclin-Gruppe waren mehr ED1-positive Zellen zu finden als in der Kontrollgruppe ($p = 0,121$) (anterior, medial und posterior zusammengefasst).

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+Minocyclin	0,007500	0,006282	0,001723	2	n. s.
	0,005063				
ELx+Indomethazin	0,001957	0,001957	0	1	n. s.
ELx+Kontroll-Puffer	0,000897	0,000448	0,000634	2	
	0				

Medial zentrale Zone

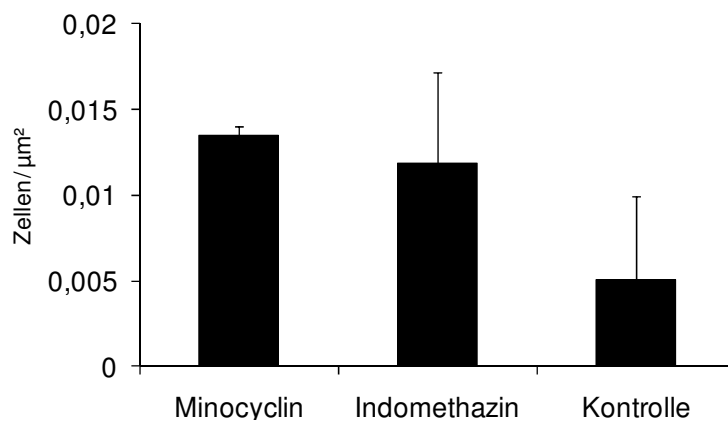
Gruppe	Zellen/µm²	Mittelwert Zellen/µm²	STD	n	Signifikanz
ELx+Minocyclin	0,001957	0,002527	0,000807	2	n. s.
	0,003098				
ELx+Indomethazin	0,002582	0,002582	0	1	n. s.
ELx+Kontroll-Puffer	0	0,000761	0,001076	2	
	0,001522				

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+	0				
Minocyclin	0,000978	0,000489	0,000692	2	n. s.
ELx+					
Indomethazin	0	0	0	1	n. s.
ELx+	0,002717				
Kontroll- Puffer	0,002210	0,002464	0,000359	2	

Tab. 70-72: Die Minocyclin-Gruppe und die Kontrollgruppe enthielten in allen drei Abschnitten markierte Zellen, während die Indomethazin-Gruppe sie nur anterior und medial hatte. Die Minocyclin-Gruppe wies im anterioren und medialen Bereich mehr Zellen als die Kontrollgruppe ($p = 0,121$) auf.

Immunmodulation: ED1-positive Zellen nach Elektroläsion und Transplantation in der zentralen Zone:



Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,013868 0,013152	0,013510	0,000506	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0,008161 0,015625	0,011893	0,005278	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0,001576 0,008533	0,005054	0,004919	2	

Abb. 50 und Tab. 73: ED1-positive Zellen im läsionsumgebenden Gewebe nach Elektroläsion und Transplantation unter Immunmodulation und in Kontrollgruppe (anterior, medial und posterior zusammengefasst). In den läsionierten, immunmodulierten, transplantierten Gruppen wurden bei Minocyclin-behandelten Tieren fast 2,7mal und bei Indomethazin-behandelten Tieren 2,4mal mehr ED1-positive Zellen als in der Kontrollgruppe nachgewiesen (Minocyclin $p = 0,121$). Minocyclin und Indomethazin verhielten sich hier ähnlich im Gegensatz zur Messung in der Peripherie.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,002826 0,002120	0,002473	0,000500	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0,000978 0,007418	0,004198	0,004554	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0,001576 0,002120	0,001848	0,000384	2	

Medial zentrale Zone

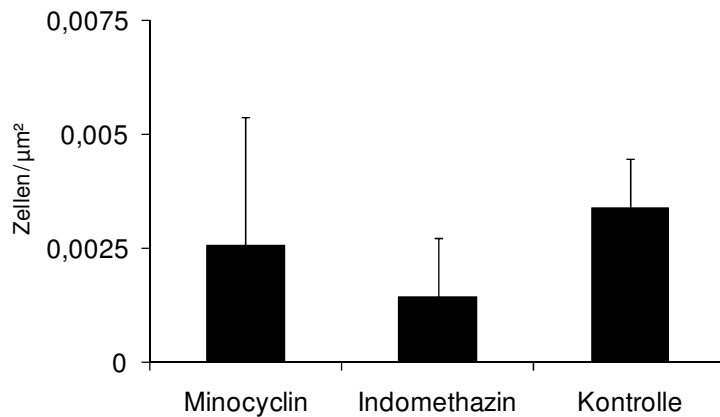
Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,004130 0,007065	0,005598	0,002075	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0,003152 0,008207	0,005679	0,003574	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0 0,005245	0,002622	0,003708	2	

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
ELx+Trans.+ Minocyclin	0,006911 0,003967	0,005439	0,002082	2	n. s.
ELx+Trans.+ Indomethazin	0,004031 0	0,002015	0,002850	2	n. s.
ELx+Trans.+ Kontroll- Puffer	0 0,001168	0,000584	0,000826	2	

Tab.74-76: Die Aufteilung in die drei Bereiche spiegelte in etwa die Gesamtdarstellung wieder. In allen Abschnitten waren Zellen zu finden. Im posterioren Abschnitt lag die Minocyclin-Gruppe mit $p = 0,121$ vor der Kontrollgruppe.

Immunmodulation: ED1-positive Zellen nach Transplantation in intakte Inselrinde in der zentralen Zone:



Gruppe	Zellen/μm²	Mittelwert Zellen/μm²	STD	n	Signifikanz
Trans.+ Minocyclin	0,001196	0,002563	0,003457	3	n. s.
	0,006495				
	0				
Trans.+ Indomethazin	0	0,001440	0,001594	3	n. s.
	0,003152				
	0,001168				
Trans.+ Kontroll-Puffer	0,002301	0,003379	0,001524	2	
	0,004457				

Abb. 51 und Tab. 77: ED1-positive Zellen in läsionszentralem Cortex nach Transplantation unter Immunmodulation und in der Kontrollgruppe (anterior, medial und posterior zusammengefasst). Es wurde keine signifikante Differenz zwischen den immunmodulierten Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt.

Räumliche Verteilung der ED1-positiven Zellen:

Anterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/μm²	Mittelwert Zellen/μm²	STD	n	Signifikanz
Trans.+ Minocyclin	0,001196	0,000399	0,000690	3	n. s.
	0				
	0				
Trans.+ Indomethazin	0	0,000389	0,000675	3	n. s.
	0,001168				
	0				
Trans.+ Kontroll-Puffer	0	0	0	2	
	0				

Medial zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0				
Trans.+ Minocyclin	0,002418				
	0	0,000806	0,001396	3	n. s.
	0				
Trans.+ Indomethazin	0,003152				
	0	0,001051	0,00182	3	n. s.
Trans.+ Kontroll- Puffer	0,002301				
	0,002935	0,002618	0,000448	2	

Posterior zentrale Zone

Gruppe	Zellen/ μm^2	Mittelwert Zellen/ μm^2	STD	n	Signifikanz
	0				
Trans.+ Minocyclin	0,004076				
	0	0,001359	0,002353	3	n. s.
	0				
Trans.+ Indomethazin	0	0	0	3	n. s.
Trans.+ Kontroll- Puffer	0				
	0,001522	0,000761	0,001076	2	

Tab. 78-80: Insgesamt waren nur in vereinzelten Tieren markierte Zellen gefunden worden. Im anterioren und posterioren Abschnitt wurden jeweils bei zwei, im medialen Bereich bei vier Tieren markierte Zellen gemessen. Die Zellen konzentrierten sich auf den medialen Bereich. Hier führte die Kontrollgruppe vor Indomethazin und Minocyclin. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

5. Diskussion

5.1 Eine kritische Betrachtung des technischen Verfahrens

In den folgenden Abschnitten werden verschiedene mögliche Fehlerquellen dieser experimentellen Arbeit dargestellt und erläutert, wie sie in den zukünftigen Versuchen abgeschwächt werden könnten.

5.1.1 Versuchstieranzahl

Wie erwähnt wurde, war diese experimentelle Arbeit als Pilotprojekt konstituiert. Im Experiment mit Immunmodulatoren wurden 20 Tiere und im kombinierten Experiment mit Zellanzahl und Läsionsart 24 Tiere in verschiedenen Behandlungsgruppen eingeteilt und untersucht. Die Tieranzahl für die einzelnen Gruppen belief sich auf ein bis drei Tiere. Dies hatte zur Konsequenz, dass die Ergebnisse aufgrund der niedrigen Gruppengröße häufig keine statistische Signifikanz erzielen konnten. Im Anschluss an dieses Projekt sollen weitere tierexperimentelle Versuche sowie immunhistochemische Auswertungsverfahren die bisher gewonnenen Tendenzen stützen.

5.1.2 Schnittqualität

Das entnommene Gewebe wurde mittels Kryo-Schnittverfahren verarbeitet. Dazu wurde das Gehirn auf das Schlittenmikrotom durch Trockeneis gefroren und einzelne Schnitte mit der Dicke von 30 µm angefertigt.

Dieses Verfahren hatte zum Nachteil, dass das Gewebe durch Gefrier- und Auftauprozesse sowie manuelle Bearbeitung leicht beschädigt wurde oder verloren ging. In der lichtmikroskopischen Analyse interpretierte man dieses fehlende Gewebe als zirkuläre Läsion.

Als nachteilig erwies sich die Schnittdicke von 30 µm in der Auswertung von ED1-positiven Zellen. Makrophagen wurden oftmals aufgrund ihrer dreidimensionalen Ausbreitung nicht in ihrem kernhaltigen Zellkörper, sondern in ihren Zellausläufern angeschnitten. Das Markersignal wurde daher als zu schwach für eine ED1-positive Zelle gewertet. Man umging dieses Problem durch die Zählung von „großen“ (mit deutlichem Zellkern) und „kleinen“ Zel-

len (schwaches Signal von wenig aktiven oder angeschnittenen Zellen durch Fokussierung entdeckt). In der Auswertung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden „Zellgruppen“. Eine dünnere Schnittdicke würde eine noch genauere Zählung der Zellen ermöglichen und die Messung noch näher an die Realität heranbringen.

5.1.3 Histologische Analyse

Bei den histologischen Färbeprozessen wurden die angefertigten Gewebsschnitte z. B. durch Wirkung von Färbungsreagenzien, manuellen Übertragungen bei Waschvorgängen und Aufziehen auf Objektträger zusätzlich stark beansprucht. So wurden auch hier Artefakte und Verluste von Parenchym und Transplantaten verursacht.

Für eine genauere Typisierung der Transplantatzellen kann man eine NeuN-Färbung, welche neu entstandene Nervenzellen markiert, durchführen (Mullen et al., 1992). Die Markierung von GFAP-positiven Astrozyten stellt eine Narbenbildung dar (Eng et al., 1992; Hatten et al., 1991; Reier et al., 1989; zusammengefasst in Frisé et al., 1995). Die Zellen könnten damit den jeweiligen Zelltypen besser zugeordnet werden. Eine detailliertere Angabe für das Wachstum, Überleben und Integrität der transplantierten Zellen in das Empfängergewebe wäre somit möglich. Eine Unterscheidung von endogenen und exogenen NSC wurde in diesen Versuchen nicht durchgeführt.

Der ED1-Antikörper markiert das lysosomale Antigen CD 68 in Makrophagen und Monozyten. Diese Zellen kommen in allen Organen der Ratte vor (Damoiseaux et al., 1994). Je aktiver sie phagozytieren, desto stärker werden sie mit ED1 gefärbt (Dijkstra et al., 1985; Damoiseaux et al., 1994). Nach Knochenmarkstransplantationen kann so eine subklinische Abstoßungsreaktion durch ED1-Antikörper verifiziert werden (Brown et al., 2009). Aktivierte Mikroglia wird durch die ED1-Färbung markiert. Es gibt Hinweise, dass aber auch Zellen wie Granulozyten und Fibroblasten CD 68 in geringem Maße exprimieren, wenn sie phagozytieren (Damoiseaux et al., 1994). Daher ist eine zu hohe Messung an aktivierter Mikroglia nicht vollständig auszuschließen. Da es bisher keinen unumstrittenen Marker für Mikroglia gibt, wäre eine sichere Abklärung der Zellentität daher nur mit dem Elektronenmikroskop möglich. Dieser aufwendigen Untersuchungsmethode sind durch Engpässe in der Kapazität und Einsetzbarkeit z. B. in *in vivo*-Versuchen und hohes finanzielles Aufkommen erhebliche Einschränkungen entgegengesetzt. Somit wird eine eindeutige Differenzierung

von Mikrogliazellen auch weiterhin nur durch den Einsatz von mehreren Markern, z. B. Lectin GSA I-B4 (Streit, 1990), zusammen möglich sein (Giulian et al., 1995; Guillemin et al., 2004).

5.1.4 Funktionalitätsüberprüfung

Um neben den histologischen Auswertungen auch die Funktionalität der transplantierten Stammzellen objektiv messbar zu machen, wäre eine CTA-Testung sinnvoll. Auf diese Weise kann beobachtet werden, ob und in welchem Ausmaß die transplantierten Stammzellen die Funktion des zerstörten Gewebes ersetzen können (Bures et al., 1998; Piña et al., 2004). Die Zusammenhänge zwischen Ergebnisse der Funktionsuntersuchung und histologischer Auswertung des Gewebes können detaillierter untersucht werden.

5.2 Anzahl der Zellen

In dieser Versuchsreihe wurde der Zusammenhang mit transplantierte Zellmenge und Wachstum im Empfängergewebe untersucht.

Bezüglich der Auswirkung von unterschiedlicher Anzahl an transplantierten Stammzellen gibt es in der aktuellen Forschung noch keine eindeutige Richtungsangabe. Zwei Versuche geben einen Hinweis, dass mehr transplantierte Nervenzellen eine stärkere Verbesserung der neurologischen Ausfälle bewirken. Saporta et al. transplantierten 0, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 x 10³ humane Neuroteratocarcinom-Neurone intrastriatal. Die Versuchstiere mit 40, 80 und 160 x 10³ Zellen zeigten eine dosisabhängige Verbesserung u.a. in der Motorik. In den Gruppen mit 80 und 160 x 10³ transplantierten Zellen überlebten 12-15% der Zellen, während die Gruppe mit 40 x 10³ Zellen eine Überlebensrate von 5% aufwies (Saporta et al., 1999). Kondziolka et al. transplantierten 12 Patienten mit Schlaganfall eine unterschiedliche Anzahl an NT2/D1-Neuronen (2 Millionen versus 6 Millionen Zellen / Patient). Sie zeigten, dass die Patienten mit 6 Millionen Zellen ihre Fähigkeiten tendenziell mehr verbessern konnten als die Betroffenen mit der geringeren Zellmenge (Kondziolka et al., 2000).

In unserem Experiment zeigte sich beim Vergleich der Transplantate in intakter Inselrinde eine tendenziell größere Fläche (fest + locker) zugunsten der Gruppe mit 50.000 Zellen. Dies war unter anderem auf die überdurchschnittliche Fläche mit lockerem Transplantat (ca. 7fach

größer als Tiere mit gleicher Behandlung) und gesamtem Transplantat (ca. 3,5fach größer als Tiere mit gleicher Behandlung) von Tier R 18 zurückzuführen. Wurde dieses nicht mit einberechnet, stellte sich eine 1,8mal größere Transplantatfläche (fest + locker) der Gruppe mit 500.000 Zellen dar. Festes Transplantat ähnelte morphologisch dem nativen Gehirngewebe der Inselrinde. Es wurde angenommen, dass hier eine regelhafte Integration der transplantierten Zellen stattgefunden hat (Piña et al., 1994). Mittels einer GFAP-Färbung (Darstellung von Astroglia) kann man eine Narbenbildung nachweisen und so die Integration der Transplantate weiter beurteilen (Eng et al., 1992; Hatten et al., 1991; Reier et al., 1989; zusammengefasst in Frisén et al., 1995).

Eine weitere Möglichkeit, eine Abwehrreaktion darzustellen, war die Kennzeichnung von aktivierten Makrophagen durch ED1 (Brown et al., 2009). In der Messung von ED1-positiven Zellen in der Peripherie hatte die Gruppe mit 500.000 Zellen mehr ED1-positive Zellen als die Gruppe mit 50.000 Zellen ($p = 0,127$, anterior, medial und posterior zusammengefasst), wobei im medialen Abschnitt, in dem alle Tiere Zellen aufwiesen, der Unterschied noch deutlicher wurde ($p = 0,077$). In der zentralen Zone unterschieden sich die Gruppen nicht. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die höhere Zellanzahl an Stammzellen eine stärkere Immunreaktion zumindest peripher hervorrief. Warum sich zentral um die Stammzellen keine Differenz zwischen den Gruppen zeigte, konnte nicht erklärt werden. Möglicherweise war der neuroprotektive, antiinflammatorische Effekt der transplantierten neuralen Stammzellen in direkter Nachbarschaft zu den Stammzellen stärker ausgeprägt als in der peripheren Zone (Einstein et al., 2003; Teng et al., 2002; zusammengefasst in Einstein et al., 2008). Die erhöhte Anzahl an aktivierten Makrophagen in der Peripherie sollte aber nicht unbedingt eine schlechtere Ausgangslage der Gruppe mit 500.000 Zellen bedeuten. Wie Aarum et al. zeigten, breiteten sich Stammzellaggregate entlang eines Mikroglia-Gradienten besser aus als ohne Mikroglia. Zudem unterstützte Mikroglia ihre Differenzierung zu Neuronen (Aarum et al., 2003). Diese Beobachtung wurde von der Forschungsgruppe um Deierborg bestätigt (Deierborg et al., 2010). Durch Sezernierung von neuroprotektiven Botenstoffen wie z. B. „Glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF) und „Brain derived neurotrophic factor“ (BDNF) (Suzuki et al., 2001; zusammengefasst in Kitamura et al., 2003) schützte Mikroglia vorhandene Neurone (Heumann et al., 1987; Gomez-Pinilla et al., 1990; Araujo et al., 1992; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999) und verminderte sogar den Gewebeschaden (Kitamura et al., 2003). Durch intraarterielle Zufuhr von exogener Mikroglia konnte dieser neuroprotektive Effekt der Makrophagen verstärkt werden (Imai et al., 2007). Diese Ergebnis-

se bekräftigen unsere Feststellung, dass Transplantate mit 500.000 Zellen trotz der erhöhten Mikrogliaaktivierung besser überleben und sich besser integrieren konnten als in der Gruppe mit 50.000 Zellen. Weitere histologische Untersuchungen des Gewebes, wie unter 5.1.3 beschrieben, sollen hier mehr Aufschluss geben.

In der NMDA-Versuchsreihe war der hohe Anteil an lockerem Transplantatgewebe auffällig. NMDA schädigt selektiv Nervenzellen und hinterlässt eine relativ unberührte Infrastruktur für die transplantierten Stammzellen (Arundine et al., 2004; Lipton und Rosenberg, 1994; zusammengefasst in Lynch et al., 2002). Diese konnten sich in den Zellzwischenräumen verteilen. Allerdings zeigte das lockere Transplantatgewebe keine vollständige morphologische Regeneration. In der ED1-Färbung hatte die Kontrollgruppe sowohl peripher als auch zentral am meisten markierte Makrophagen ($p = 0,083$). Dies war bedingt durch den denaturierenden Effekt des Läsionsvorganges mit anschließender Abräumreaktion (Peterson und Dailey, 2004; Lipton und Rosenberg, 1994; zusammengefasst in Lynch et al., 2002; Compston, 2007). Der deutliche Unterschied zu den transplantierten Gruppen lag möglicherweise am immunsuppressiven, neuroprotektiven Effekt der Stammzellen (Einstein et al., 2003; Llado et al., 2004). Messungen von neuroprotektiven, antiinflammatorischen Faktoren könnten hierüber genaueren Aufschluss geben (Martino und Pluchino, 2006). Zwischen den verschiedenen Zellmengen konnte bis auf eine signifikante Differenz im posterioren Abschnitt (peripher und zentral) mit $p = 0,046$ zugunsten der Gruppe mit 500.000 Zellen kein Unterschied in der Entzündungsreaktion festgestellt werden. Durch die höhere Zellanzahl breitete sich hier möglicherweise das Transplantat nach posterior stärker aus und verursachte somit diesen signifikanten Unterschied.

In der Reihe mit der Elektroläsion zeigte sich ein größeres Transplantat (fest + locker) in der Gruppe mit 50.000 Zellen gegenüber der Gruppe mit 500.000 Zellen ($p = 0,127$). Es müsste durch eine Erhöhung der Tieranzahl abgeklärt werden, ob sich diese Differenz erhärten ließe. Denn diese Feststellung würde dem Versuch mit der Transplantation in die intakte Inselrinde widersprechen, nämlich, dass eine höhere Anzahl an Stammzellen ein besseres Wachstum und bessere Integration ins Empfängergewebe bewirkt (Kondziolka et al., 2000; Saporta et al., 1999). In der ED1-Färbung zeigte sich peripher in den gegenüber gestellten Gruppen kein eindeutiger Unterschied. Direkt um die Läsion hatte die Gruppe mit 50.000 Zellen im medialen ($p = 0,083$) und posterioren Bereich weniger markierte Makrophagen als die Kontrollgruppe. Auch diese Feststellung würde die These der neuroprotektiven und

antiinflammatorischen Wirkung von neuronalen Stammzellen bekräftigen (Einstein et al., 2003; Pluchino et al., 2005).

Zusammenfassend konnte in diesem Experiment festgestellt werden, dass transplantierte adulte Stammzellen in intakter Inselrinde, nach NMDA-Läsion und nach Elektroläsion das Auftreten von aktivierten Makrophagen unterdrückten. Dies bestätigte die bisherige Meinung, dass neurale Stammzellen antiinflammatorisch auf das Umgebungsgewebe wirken (Einstein et al., 2003; Llado et al., 2004). Die Stammzelltransplantation in intaktes Cortexgewebe gab den Hinweis, dass 500.000 Zellen besser wachsen und sich integrieren können als 50.000 Zellen.

5.3 Läsionsart

In dieser Versuchsreihe wurden zwei verschiedene Läsionsarten, welche auf unterschiedliche Weise das Empfängergewebe schädigten, gegenübergestellt. Eine Woche nach Läsionierung durch Injektion von NMDA oder Elektroläsion erhielten die Tiergruppen 50.000 Zellen / 5 µl oder 500.000 / 5 µl Zellen pro Hemisphäre implantiert.

Bisher wurden die beiden Läsionstypen in der Forschung noch nicht direkt miteinander verglichen. Jedoch gibt es ähnliche Versuche, z. B. beim experimentellen Parkinsonmodell. Man verglich die 6-OHDA-Injektion und Elektroläsion in der Substantia nigra, wodurch dopaminerge, nigrostriatale Neurone geschädigt wurden (Jeon et al., 1995; zusammengefasst in Gerlach et al., 2007). Die Tiere mit Elektroläsion zeigten ein anderes Drehverhalten als Tiere mit 6-OHDA-Läsion. Dies wurde auf den ausgedehnteren Schaden durch Elektroläsion zurückgeführt, der nicht nur dopaminerge nigrostriatale Nervenzellen, sondern weitere strukturelle Bahnen betraf (Costall et al., 1976). In einem anderen Modell wurden Elektroläsion und selektive, neurotoxische Läsion mit Ibotensäure im Hypothalamus gegenübergestellt. Hier zeigten die elektroläsionierten Tiere eine größere funktionelle Einschränkung als die neurotoxisch behandelten (Markowska et al., 1985).

Im Vergleich der beiden Läsionsarten ohne Transplantation fiel die Fläche der NMDA-Läsion größer aus als die der Elektroläsion ($p = 0,121$). In der ED1-Färbung wies die NMDA-Läsion peripher mehr aktivierte Makrophagen auf als die Elektroläsion. Zentral war kein Unterschied erkennbar. Der Grund für die Flächendifferenz lag am ehesten in der unterschiedlichen Wirk-

weise der beiden Läsionsarten. So bewirkte NMDA durch spezifische Überstimulation den Untergang von Nervenzellen (Arundine et al., 2004), während die übrigen Gefäß- und Stützzellen nicht beschädigt wurden. Die NMDA-Lösung wurde in gesundes Gewebe injiziert. Sie verteilte sich aufgrund des Gewebedruckes nahezu gleichmäßig und verursachte einen ausgeprägten Neuronenschaden. Die abgestorbenen Zellen aktivierten Makrophagen aus der Peripherie (Streit, 2001) zur Phagozytose. Bei der Elektroläsion bewirkte die lokal einwirkende Elektrizität einen flächenmäßig beschränkten Kollateralschaden, so dass häufig das Bild eines „Loches“ in Erscheinung trat (Compston et al., 2007; Kadin et al., 1969), teilweise gefüllt mit Detritus und Makrophagen (Li et al., 1998). Ob sich die transplantierten NSC im jeweiligen Läsionsgebiet gut etablieren können, hängt unter anderem an der Schädigung des Gewebes ab. Kondziolka et al. transplantierten 2005 in einem Phase-II-Versuch NT2/D1-humane neuronale Zellen stereotaktisch intrastriatal in Patienten mit motorischen Defiziten nach Hirninsult. Sie erhielten entweder 5 oder 10 Millionen Zellen. Letztere Gruppenmitglieder erhielten teilweise eine anschließende Rehabilitationsbehandlung. Zudem erhielten alle Patienten Cyclosporin A als Immunsuppressivum. Insgesamt zeigten die Patienten mit 5 Millionen Zellen eine tendenzielle Verbesserung in ihren Alltagskompetenzen auf, eine signifikante Anhebung konnte nicht festgestellt werden. Als möglichen Einflussfaktor nannten die Autoren den überwiegenden Anteil an ischämischen Insulten im Vergleich zur Gruppe mit 10 Millionen Zellen, worin vor allem hämorrhagische Ereignisse zugrunde lagen (Kondziolka et al., 2005). Hier deutete sich an, dass nicht nur die Anzahl an transplantierten Zellen ausschlaggebend für eine erfolgreiche Funktionswiedererlangung ist, sondern auch wie und in welchem Umfang das Gewebe geschädigt wurde (Bookvar et al., 2005).

Herrera et al. stellten fest, dass nach exzitatorischer Läsion und Transplantation von nicht-kultiviertem SVZ-Gewebe in den Cortex Astrozyten aus den Stammzellen hervorgingen. Diese neu gebildeten Zellen migrierten nur in die nächste Umgebung des Transplantatgewebes (Herrera et al., 1999). Erst nach Kultivierung mit FGF-2 und anschließender Transplantation differenzierten sich aus adulten Stammzellen der SVZ Neurone und migrierten verstärkt ins Empfängergerewebe (Zhang et al., 2003; Wu et al., 2006). Nach Transplantation von 50.000 und 500.000 Zellen wurde in der NMDA- und ELx-Gruppe vor allem morphologisch locker angeordnetes Zellgewebe vorgefunden, wobei die NMDA-Gruppe die ELx-Gruppe übertraf ($p = 0,050$). Die Größendifferenz zwischen den beiden Läsionen beeinflusste wahrscheinlich auch diesen Unterschied in der Transplantatgröße. Eine zusätzliche immunreaktive Untersuchung, z. B. mit dem neuronenspezifischen Marker NeuN oder einer Messung von GFAP-

positiven Astrozyten, würde die Verteilung, das Migrationsverhalten ins Empfängergewebe, sowie die Differenzierung der transplantierten Stammzellen und das Ausmaß einer Narbenbildung genauer beschreiben (Mullen et al., 1992; Eng et al., 1992; Hatten et al., 1991; Reier et al., 1989; zusammengefasst in Frisé et al., 1995).

Bei den ED1-positiven Zellen hatten bei 50.000 Zellen beide Läsionsarten in der peripheren Zone mehr markierte Zellen als die Kontrollgruppe (zwischen ELx-Gruppe und Kontrollgruppe war $p = 0,050$), unterschieden sich untereinander aber nicht wesentlich. Auch bei 500.000 Zellen hatten beide läsierten Gruppen peripher annähernd gleich viele ED1-positive Zellen, wobei hier die Kontrollgruppe mehr Makrophagen aufwies (n. s.). In der zentralen Zone wies die ELx-Gruppe sowohl bei 50.000 Zellen als auch bei 500.000 Zellen mehr ED1-positive Zellen als die NMDA-Gruppe (n. s.) und die Kontrollgruppe ($p = 0,050$) auf. Die ELx verursachte einen eher lokalen Schaden mit einer zirkulär um die Läsion beschränkte Immunreaktion. Die Aktivität dieser Abwehrreaktion war, unabhängig von der Anzahl an NSC, höher als bei der NMDA-Gruppe oder der Kontrolle.

Zusammengefasst wurden in den elektroläsionierten Gruppen (50.000 Zellen und 500.000 Zellen) im direkt dem Transplantat anliegendem Gehirngewebe mehr aktive Makrophagen gefunden, was für eine erhöhte Abwehrreaktion sprach (Piña et al., 2004). Es war vorstellbar, dass eine lokale, aber unspezifische elektrische Läsion einen ausgeprägteren Gewebeschaden verursachte als in der exzitotoxischen, gegen Neurone gerichteten NMDA-Läsion. Die Injektion von NMDA verursachte einen volumenmäßig größeren Defekt. Infolge dessen kam es zu einer flächenmäßig ausgedehnteren Abwehrreaktion peripher der Injektionsstelle als durch ELx. Die Transplantatfläche in der NMDA-Läsion war gegenüber der ELx erhöht, jedoch wies sie hauptsächlich locker angeordnetes Gewebe auf, was für einen nicht vollständigen Gewebeersatz sprach.

5.4 Immunmodulation

In dem Experiment mit immunmodulierenden Medikamenten wurde durch Zufuhr von elektrischem Strom eine chemische „Überspannung“ mit Verschiebung von Elektrolyten ausgelöst, welche (neben thermischer Denaturierung von Proteinen) über Depolarisation und Übererregung in zellauflösende Vorgänge endete (Kadin, 1969). Durch freigesetzte Botenstoffe oder intrazelluläre Bestandteile wurde Mikroglia aktiviert. Die bisherige Forschung stellte fest,

dass Mikroglia sowohl pro- als auch antiinflammatorisch und neuroprotektiv nach einem ischämischen oder exzitatorischen Gewebeschaden wirkt (Streit, 2001; Hoehn et al., 2005; Hanisch, 2002; Kim und de Vellis, 2005; Shin et al., 2004; Bruce-Keller, 1999). Je nachdem, wie sie agiert, ist abhängig von der Art des Stimulus (Hanisch und Kettenmann, 2007; zusammengefasst in Deierborg et al., 2010). Sie selbst gab Chemokine frei und bot Proteinbestandteile von zerstörten Zellen anderen Immunzellen an, um schließlich eine ausgedehnte Entzündungsreaktion zu entfachen (Monje et al., 2003; Gagliardi et al., 2000; Hanisch, 2002).

Die Versuchstiere erhielten zwei verschiedene immunmodulatorische Medikamente, Indomethazin und Minocyclin. Indomethazin wirkt antiinflammatorisch durch Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 (Fosslien, 2000; Hoehn et al., 2005; Reichman et al., 1986; Monje et al., 2002). Neuere Studien über Minocyclin, welches die *p38MAPK* inhibiert, berichteten nicht mehr nur über eine neuroprotektive, sondern auch über eine mögliche neurodegenerative Wirkung des Medikamentes (Ekdahl et al., 2003; Tikka et al., 2001; Matsukawa et al., 2009; Tsuji et al., 2004; Deierborg et al., 2010).

Die CV-Färbung wies bei den immunmodulierten, elektroläsionierten Gruppen keinen eindeutigen Unterschied hinsichtlich der Läsionsgröße im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Die antiinflammatorische Wirkung der Medikamente ergab keine Verringerung der Läsionsgröße im Vergleich zu den nicht immunmodulierten Kontrolltieren. Dieses Ergebnis konnte daher bisherige Untersuchungsbefunde (Tikka et al., 2001; Reichman et al., 1986; Monje et al., 2002; zusammengefasst in Monje et al., 2003, Matsukawa et al., 2009) nicht bestätigen. In der Versuchsreihe hatte die Minocyclin-Gruppe sowohl in der peripheren als auch in der zentralen Zone mehr ED1-positive Zellen vorzuweisen als die Kontrollgruppe ($p = 0,121$). Die deutliche Zunahme von aktivierter Mikroglia in der Minocyclin-Gruppe sprach gegen die bisherige Annahme der Neuroprotektion und Mikroglia-inhibition von Minocyclin (Tikka et al., 2001) und würde die Beobachtung von Deierborg et al. bestätigen. Minocyclin unterdrückte die in läsionierten Tieren vorkommende Mikroglia. Diese konnte die NSC nicht mehr aktivieren und es folgte ein Rückgang der NSC-Proliferation (Deierborg et al., 2010). Es stellte sich nun die Frage, ob es im Fall der Anwendung von 50 mg / kg Minocyclin, wie es in unserem Experiment verwendet wurde, zu einer toxischen Wirkung des Medikamentes gekommen ist. Dies würde die Zunahme an aktivierter Mikroglia erklären und die Beobachtungen von Matsukawa bestätigen. Wie Matsukawa et al. beschrieben, ist die neuroprotektive antientzündliche Wirkung von Minocyclin dosisabhängig. Unter Verwendung von 20 mg / kg war das Medikament

neuroprotektiv. Bei einer verabreichten Gabe von 100 mg / kg kam es zu einer signifikanten Zunahme des Läsionsvolumens und sogar zu contralateralen Infarkten in Relation zur Kontrollgruppe (Matsukawa et al., 2009). Daraus würde schlussfolgern, dass, wenn die Dosis zu hoch war und schädlich auf das Gewebe wirkte, in der vorliegenden Arbeit die Läsionsfläche in der Minocyclin-Gruppe größer sein müsste als die in der Kontrollgruppe. Dies stand unseren Messungen entgegen. Möglicherweise lag aber auch die Dosis an der Schwelle zur darstellbaren Gewebeschädigung in der CV-Färbung. Weitere detailliertere Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Dosis und Wirkung mit morphologischen und funktionellen Auswertungen werden zur Einschätzung dieses Versuchsergebnisses notwendig sein. In der Indomethazin-Gruppe konnte dagegen bezüglich Läsionsgröße und Anzahl aktivierter Makrophagen kein wesentlicher Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dieses Ergebnis widersprach bisherigen Forschungsergebnissen (Hoehn et al., 2005; Monje et al., 2003). Jedoch konnte auch kein relevanter negativer Einfluss des Immunmodulators beobachtet werden.

Nach Elektroläsion mit anschließender Transplantation zeigten die immunmodulierten Gruppen, morphologisch betrachtet, mehr kompaktes Gewebe bei insgesamt kleinerer Transplantatfläche als die Kontrollgruppe ($p = 0,121$). Die Kontrolle wies dagegen mehr fehlendes Gewebe auf ($p = 0,121$). In der Minocyclin-Gruppe waren peripher und zentral tendenziell mehr aktivierte Makrophagen zu erkennen als in der Kontrolle ($p = 0,121$). Währenddessen zeigten die immunmodulierten Gruppen in der zentralen Zone ein annähernd ähnliches Verhalten. Auch hier stellte sich die Frage, warum in der immunmodulierten Gruppe mit Minocyclin peripher und zentral erneut eine größere Entzündungsreaktion durch aktivierte Makrophagen hervorgerufen wurde. Ähnliches konnte, zumindest in der zentralen Zone, von Indomethazin vermutet werden. Die erhöhte Anzahl an aktivierten Makrophagen unter Immunmodulation widersprach den bisherigen Forschungsergebnissen (Hoehn et al., 2005; Reichman et al., 1986; Monje et al., 2002; zusammengefasst in Monje et al., 2003). Andererseits zeigte sich auch, dass die Transplantate in den immunmodulierten Gruppen morphologisch mehr dem normalen Cortexgewebe ähnelten und bei ihnen somit eine gute Integrität anzunehmen war. Möglicherweise trat hier unter Einfluss von transplantierten NSC die neuroprotektive Wirkung von Mikroglia in den Vordergrund und förderte die Proliferation der NSC (Kitamura et al., 2003; Aarum et al., 2003; Heumann et al., 1987; Gomez-Pinilla et al., 1990; Araujo et al., 1992; zusammengefasst in Bruce-Keller, 1999). Diese Feststellung widersprach den Ergebnissen bisheriger eigener Laborversuche (Piña et al., 2004) und der Beobachtung unter Elekt-

roläsion mit Immunmodulation (siehe oben). Um den Zusammenhang zwischen Ausprägung an Mikroglia-Aktivierung, Überleben und Integration der NSC unter Immunodulation erneut zu verifizieren, sind weitere Untersuchungen auf z. B. Funktionaliät, Anzahl der Neurone und Struktur des *Microenvironments* notwendig.

In der Versuchsreihe mit der Transplantation in die intakte Inselrinde wurde kein eindeutiger Unterschied zwischen den immunmodulierten Gruppe und der Kontrollgruppe festgestellt. Hinsichtlich der aktivierten Makrophagen in der peripheren Zone lagen die Immungruppen etwas vor der Kontrollgruppe (n. s.). In der zentralen Zone führte die Kontrollgruppe leicht vor Minocyclin und Indomethazin (n. s.). Zu erwarten wäre eine deutliche Abnahme der aktivierten Makrophagen unter Immunmodulation gewesen (Hoehn et al.; 2005, Monje et al., 2003; Ekdahl et al., 2003). Anscheinend konnte hier kein Immunmodulator entscheidend auf die körpereigene Abwehrreaktion gegen transplantierte Stammzellen wirken (Brown et al., 2009). Durch die systemische Immunmodulation wurde die Abwehrreaktion direkt am Transplantat vermindert, wobei eine allgemeine Aktivierung des Immunsystems mit Beteiligung der Penumbra nicht vollständig unterdrückt wurde. Möglicherweise spielte hier die neuroprotektive, antiinflammatorische Wirkung der transplantierten Stammzellen eine wichtigere Rolle und reduzierte die Entzündungsreaktion insgesamt (Einstein et al., 2003; Pluchino et al., 2005). Die Wirkung der Immunmodulatoren fiel dabei nicht signifikant ins Gewicht.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Minocyclin nach Elektroläsion mit und ohne Transplantation von NSC eine tendenziell stärkere Aktivierung an Mikroglia auslöste. Ob sich diese nun letztendlich positiv oder negativ auf das Gewebe und die transplantierten NSC auswirkte, konnte durch die eingesetzten Untersuchungsprozeduren und der aktuellen, sich widersprechenden Ergebnisse in der aktuellen Forschung nicht eindeutig geklärt werden. Eine genauere Analyse von Dosis und Wirkung des klinisch verwendeten Medikamentes ist daher notwendig, um eventuelle Nebenwirkungen im klinischen Einsatz zu verhindern.

6. Literatur

Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. PNAS Dec 100(26):15983-15988

Altman J (1961) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. J Comp Neurol 136(3):269-293

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol 124(3):319-335

Altman J, Das GD (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. J Comp Neurol 126:337–389

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. J Neurosci 22(3):629-634

Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Research Bulletin 57(6):751-758

Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41:683-686

Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A, Constantini S, Rechavi G (2009) Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med 6(2):221-231

Andres RH, Choi R, Steinberg GK, Guzman R (2008) Potential of adult neural stem cells in stroke therapy. *Regenerative Medicine* 3(6):893-905

Araujo DM, Cotman CW (1992) Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors. *J Neurosci* 12:1668-1678

Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell and Mol Life Sci* 62:657-668

Ashwell K (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55:219–230

Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Philips J, Lanier L, Somoza C (1993) B7 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366:76-79

Banasiak K, Ying X, Daddad G (2000) Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiol* 62(3):215-249

Bezzi P, Volterra A (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11:387-394

Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22(3):123-131

Bö L, Monk S, Kong P, Nyland H, Pardo C, Trapp B (1994) Detection of MHC class II antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 51:135–146

Boockvar JA, Schouten J, Royo N, Millard M, Spangler Z, Castelbuono D, Snyder E, O'Rourke D, McIntosh T (2005) Experimental Traumatic Brain Injury Modulates the Survival, Migration, and Terminal Phenotype of Transplanted Epidermal Growth Factor Receptor-activated Neural Stem Cells. *Neurosurgery* 56(1):163-171

Bottai D, Fabrizio R, Gelain F, Defilippis L, Galli R, Gritti A, Vescovi LA (2003) Neural stem cells in the adult nervous system. *J Hematother Stem Cell Res* 12(6):655-670

Brown R, Lefebvre D, Tai C, Matthews M, Strande L, Eydelman R, Hewitt CW (2009) ED-1 is a marker for activated macrophages and subclinical graft versus host disease in vascularized stem cell transplants. *FASEB J* 23:1004.7

Bruce-Keller AJ (1999) Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 58:191-201

Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T (1998) Conditioned taste aversion – Memory of a special kind. Oxford psychology series No. 31; Oxford science publications, Oxford

Cameron HA, Wooley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neuron and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci* 56:337–344

Compston A (2007) The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. *Brain* 130:1449-1452

Costall B, Marsden CD, Naylor RJ, Pycock CJ (1976) The relationship between striatal and mesolimbic dopamine dysfunction and the nature of circling responses following 6-hydroxydopamine and electrolytic lesions of the ascending dopamine systems of rat brain. *Brain Res* 118(1):87-113

Cunningham TJ (1982) Naturally occurring neuron death and its regulation by developing neural pathways. *Int Rev Cytol* 74:163–186

Damoiseaux JGMC, Döpp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD (1994) Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83:140-147

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local injury *in vivo*. *Nat Neurosci* 8(6):752-758

Deierborg T, Roybon L, Inacio AR, Pesic J, Brundin P (2010) Brain injury activates microglia that induce neural stem cell proliferation *ex vivo* and promote differentiation of neurosphere-derived cells into neurons and oligodendrocytes. *Neurosci* 171:1386–1396

De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peshle C, Aloisi F (1995) The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropath Exp Neurol* 54:175-187

Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies EDI, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-599

Ding L, Linsley P, Huang L, Germain R, Shevach E (1993) IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the upregulation of B7 expression. *J Immunol* 151:1224-1234

Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14895-14900

Doetsch F, Garcia-Verdugo M, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience* 17(13):5046–5061

Doetsch F, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97(6):703-716

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transi-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36(6):1021-1034

Einstein O, Karussis D, Grigoriadis N, Mizrachi-Kol R, Reinhartz E, Abramsky O, Ben-Hur T (2003) Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci* 24(4):1074-1082

Einstein O, Fainstein N, Vaknin I (2007) Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann Neurol* 61(3):209-218

Einstein O, Ben-Hur T (2008) The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. *Arch Neurol* 65(4):452-456

Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(23):13632-13637

Eng LF, Yu ACH, Lee YL (1992) Astrocytic response to injury. *Progress in Brain Res* 94:353-365

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4(11):1313-1317

Fagan SC, Edwards DJ, Borlongan CV, Xu L, Arora A, Feuerstein G, Hess DC (2004) Optimal delivery of minocycline to the brain: implication for human studies of acute neuroprotection. *Exp Neurol* 186(2):248-251

Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta I, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S (2000) *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(26):14686-14691

Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49(6):377-391

Fosslien E (2000) Biochemistry of Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37(5):431-502

Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates MA, Bjorklund A (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* 19:5990-6005

Frisén J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U (1995) Rapid, widespread, and long-lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Bio* 131(2):453-464

Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Natl Acad Sci USA* 92:11879-11883

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438

Gagliardi R (2000) Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arq Neuropsychiatr* 58:583-588

Gehrmann J, Banati RB (1995) Microglial turnover in the injured CNS: Activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:680-688

Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: Intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Rev* 20:269-287

Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2007) *Die Parkinson-Krankheit – Grundlagen, Klinik, Therapie*. Springer-Verlag, Wien, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage

Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li, X, Kirkpatrick JB (1995) Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J Neurosci* 15:7712-7726

Goh EL, Ma D, Ming G-L, Song H (2003) Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *J Hematother Stem Cell Res* 12(6):671-679

Gomez-Pinilla F, Cummings BJ, Cotman CW (1990) Induction of bFGF in AD pathology. *NeuroReport* 1:211-214

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548-552

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Aroz C (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(19):7611-7615

Gritti A, Frölichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, Bjornson CR, Vescovi AL (1999) Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 19(9):3287-3297

Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Garcia Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL (2002) Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22(2):437–445

Guéneau G, Privat A, Drouet J, Court L (1982) Subgranular zone of the dentate gyrus of young rabbits as a secondary matrix. A high-resolution autoradiographic study. *Dev Neurosci* 5:345-358

Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukocyte Biology* 75:388-397

Haas S, Weidner N, Winkler J (2005) Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* 18:59-64

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387–1394

Hanisch UW (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155

Hatten ME, Liem RKH, Shelanski ML, Mason CA (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* 4:233-243

Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol* 46:867-877

Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E, Thoenen H (1987) Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8735-8739

Hoehn BD, Palmer TD, Gary K (2005) Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 36:2718-2724

Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, Sano H, Sawada M (2007) Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J Cerebr Blood Flow & Metab* (2007) 27:488–500

Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4(2):131-137

Jin K, Zhu Y, Sun Y, Ou MX, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(18): 11946–11950

June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB (1994) The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 15:321-331

Kadin L, Egerman EB, Gutkin VS, Starkov RI (1969) Apparatus for electrolytic destruction of subcortical brain structures. All-Union Research Institute of Surgical Apparatus and Instruments. N. N. Burdenko Research Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, No 5, pp. 18–22

Karow T, Lang-Roth R (2004) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 12. Auflage, Pulheim

Kempermann G, Neumann H (2003) Mikroglia: The enemy within? *Science* 302:1689-1690

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10409-10414

Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg GW (1990) Cultured microglia cells have a distinct pattern of membrane channels that differ from peritoneal macrophages. *J Neurosci Res* 26:278-287

Kim JS (1996) Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci* 137:69-78

Kim SU, de Vellis J (2009) Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J Neurosci Res* 87(10):2183-2200

Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313

Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Alvarez-Buylla A (1999) Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19(6):2171-2180

Kitamura Y, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Yanagisawa D, Nakata J, Taniguchi T (2003) Intracerebroventricular injection of Microglia protects against focal brain ischemia. *J Pharmacol Sci* 94: 203-206

Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L (2000) Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55:565-569

Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, Gebel J, Decesare S, Jovin T, Zafonte R, Lebowitz J, Flickinger JC, Tong D, Marks MP, Jamieson C, Luu D, Bell-Stephens T, Teraoka J (2005) Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 103(1):38-45

Kreutzberg G (1996) Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318

Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal Growth Factor and Fibroblast Growth Factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17(15):5820-5829

Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E (2001) Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eu Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:152-158

Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DH (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nature Neurosci* 6:21-27

Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim SJ, Kim DH, Kang KM, Hong NH, Kim JH, Ban JJ, Park HK, Kim SU, Park CG, Lee SK, Kim M, Roh JK (2008) Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain* 131(3):616-629

Li Y, Field PM, Raisman G (1998) Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 18(24):10514–10524

Lim DA, Fishell GJ, Alvarez-Buylla A (1997) Postnatal mouse subventricular zone neuronal precursors can migrate and differentiate within multiple levels of the developing neuraxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14832-14836

Lim DA, Alvarez-Buylla A (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7526-7531

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signalling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-726

Lim DA, Flames N, Collado L, Herrera DG (2002) Investigating the use of primary adult subventricular zone neural precursor cells for neuronal replacement therapies. *Brai Res Bull* 57(6):759-764

Ling EA, Penney D, Leblond CP (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the “amoeboid cells” present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* 193:631-657

Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *N Engl J Med* 330:613-622

Liu T, Clark RK, McConnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ (1994) Tumor necrosis factor in ischemic neurons. *Stroke* 25:1481-1488

Llado J, Haenggeli C, Maragakis N, Snyder E, Rothstein J (2004) Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* 27: 322– 331

Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11(1):173-189

Luskin MB, Zigova T, Soteres BJ, Stewart RR (1997) Neuronal progenitor cells derived from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain continue to proliferate *in vitro* and express a neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci* 8:351-366

Lynch DR, Guttman R (2002) Excitotoxicity: Perspectives based on N-methyl-D-Aspartate Receptor subtypes. *J Pharm and Exp Ther* 300:717-723

Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, Mc Mahon AP, Fishell G (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39:937-950

Mackowiak M, Chocyk A, Markowicz-Kula K, Wedzony K (2004) Neurogenesis in the adult brain. *Pol J Pharmacol* 56:673-687

Markowska A, Bakke HK, Walther B, Ursin H (1985) Comparison of electrolytic and ibotenic acid lesions in the lateral hypothalamus. *Brain Res* 328(2):313-323

Martino G, Pluchino S (2006) The therapeutic potential of neural stem cells. *Nature Rev Neurosci* 7:395-406

Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, Kaneko Y, Ojika K, Hess DC, Borlongan CV (2009) Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neurosci* 10:126

McGeer PL, McGeer EG (1995) The inflammatory response system of brain: implication for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195–218

Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI (2002) Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451:170-188

Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD (2002) Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature Med* 8(9):955-962

Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211

Mulisch M, Welsch U (2010) *Romeis – Mikroskopische Technik*, 18. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

Nimmerjahn A (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 308:1314-1318

Okano H (2002) Neural stem cells: Progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J Med* 51(3):115-128

Oppenheim RW, Prevette D, Tytell M, Homma S (1990) Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo *in vivo* requires protein and DNA synthesis: evidence for the role of cell death gene. *Dev Biol* 138:104–113

Orlacchio A, Bernardi G, Orlacchio A, Martino S (2010) Stem cells and neurological diseases. *Discovery Medicine* 9(49):546-553

Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474-486

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, London, 4. Auflage

Pearson HE, Payne BR, Cunningham TJ (1993) Microglia invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina. *Brain Res Dev Brain Res* 76:249–255

Peterson MA, Dailey ME (2004) Diverse microglial motility behaviours during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46:195-206

Petridis AK, Maarouf AE (2011) Brain-derived neurotrophic factor levels influence the balance of migration and differentiation of subventricular zone cells, but not guidance to the olfactory bulb. *J Clin Neurosci* 18(2):265-270

Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A (2004) Endogenous adult neural stem cells: Limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Research* 76:223-231

Piña AL, Van Wagenen S, Stoerr EM, Kubitza M, Wachs FP, Aigner L, Winkler J, Brawanski A (2004) Neural stem cells into the insular cortex: histological and functional recovery. *FENS* (2) A147.12

Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G (2005) Neurosphere-derived

multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. Nature 436:266-271

Pluchino S, Martino G (2008) Neural stem cell-mediated immunomodulation: repairing the haemorrhagic brain. Brain 2008 131(3):604-605

Polazzi E, Contestabile A (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. Rev Neurosci 13(3):221-242

Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. Trends Neurosci 28(11):571-573

Rasmussen M (2005) Treatment of elevated intracranial pressure with indomethacin: Friend or foe? Acta Anaesthesiol Scand 49:341-350

Reichman HR, Farrell CL, Del Maestro RF (1986) Effects of steroids and nonsteroid anti-inflammatory agents on vascular permeability in a rat glioma model. J Neurosurg 65:233-237

Reier P, Eng LF, Jakeman L (1989) Reactive astrocytes and axonal outgrowth in the injured CNS: Is gliosis really an impediment to regeneration. Neural regeneration and transplantation, FJ Seil (Ed.). Alan R. Liss Inc., New York, pp. 183-209

Richardson RM, Fillmore HL, Holloway KL, Broaddus WC (2004) Progress in cerebral transplantation of expanded neuronal stem cells. J Neurosurg 100:659-671

Roh JK, Jung KH, Chu K (2008) Adult stem cell transplantation in stroke: Its limitations and prospects. Curr Stem Cell Res Ther 3(3):185-196

Rohwedel J, K Guan, C Hegert, AM Wobus (2001) Embryonic stem cells as an *in vitro* model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. Toxicol in Vitro 15(6):741-753

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 391:96-99

- Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR (1999) Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *J Neurosci* 91(2):519-525
- Sawada M, Itoh Y, Suzumura A, Marunouchi T (1993) Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells. *Neurosci Lett* 160:131-134
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192(2):348-356
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-1340
- Shin WH, Lee D, Park KW, Kim SP, Yang M, Joe E, Jin BK (2004) Microglia expressing Interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival *in vivo*. *Glia* 46:142-152
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S (2001) Erythropoietin regulates the *in vitro* and *in vivo* production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neuroscience* 21(24):9733-9743
- Streit WJ (1990) An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). *J Histochem & Cytochem* 38(11):1683-1686
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1989a) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motoneuron injury. *Exp Neurol* 105:115-126
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1989b) Peripheral nerve lesion produces increased levels of MHC antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 21:117-123
- Streit WJ, Kreutzberg GW (1988) Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp Neurol* 268:248-263

Streit WJ (2001) Microglia and macrophages in the developing CNS. *NeuroToxicology* 22: 619–624

Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111:1843-1851

Suzuki H, Imai F, Kanno T, Sawada M (2001) Preservation of neurotrophin expression in microglia that migrate into the gerbil's brain across the blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 312(2):95-98

Szarflarski J, Burtrum D, Silverstein FS (1995) Cerebral hypoxia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 26:1093-1100

Temple S, Alvarez-Buylla A (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:135-141

Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY (2002) Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(5):3024-3029

Tikka T, Fiebich BL, Goldstein G, Keinänen R, Koistinaho J (2001) Minocycline, a tetracycline derivate, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 21(8):2580-2588

Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13:580-587

Trepel M (1999) *Neuroanatomie*, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München

Tropepe V, Sibilio M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D (1999) Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 208:166-188

Tsuji M, Wilson MA, Lange MS, Johnston MV (2004) Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Experimental Neurology* 189 (1):58-65

Uberti D, Belloni M, Grilli M, Spano P, Memo M (1998) Induction of tumour-suppressor phosphoprotein p53 in the apoptosis of cultured rat cerebellar neurones triggered by excitatory amino acids. *Eur J Neurosci* 10(1):246-254

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (1999) Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284:339-343

Wechsler LR (2009) Clinical trials of stroke therapy: Which cells, which patients? *Stroke* 40:149-151

Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16(23):7599-7609

Williams K, Bar-Or A, Ulvestad E, Olivier A, Antel JP, Yong V (1992) Biology of adult human microglia in culture: comparisons with peripheral blood monocytes and astrocytes. *J Neuropath Exp Neurol* 51:538-549

Wu KY, Ma J, Ye YL, Yuan CG (2006) The migration and differentiation of subventricular zone neural stem cells transplanted into the adult striatum. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 39(4):357-364

Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH (2004) Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 304:1253-1255

Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS (1998) Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 18(4):1363-1373

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(26): 15769–15774

Zhang RL, Zhang L, Zhang ZG, Morris D, Jiang Q, Wang L, Zhang LJ, Chopp M (2003) Migration and differentiation of adult rat subventricular zone progenitor cells transplanted into the adult rat striatum. *Neurosci* 116:373-382

Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 11(4):234-245

Zilles K (1985) The cortex of the rat. A stereotaxic atlas. Springer Verlag, Berlin

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Alexander Brawanski für die freundliche Überlassung des Themas und der Möglichkeit zur Durchführung dieser vorgelegten Untersuchungen bedanken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. Martin Proescholdt und Frau Ana-Luisa Piña für die fachliche Unterstützung und Betreuung in dieser Zeit.

Für die Züchtung und Bereitstellung der neuralen Stammzellen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ludwig Aigner bedanken.

Besonders bedanke ich mich auch bei Frau Eva-Maria Stoerr, die mich in den tierexperimentellen und histochemischen Arbeiten anleitete und unterstützte.

Zuletzt, und von ganzem Herzen, danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Gisela und Isidor Feigl, die mir meine Ausbildung ermöglichten und mich dabei stets begleiteten und unterstützten.